

**Charakterisierung der putativen
Metalloproteasen YfgC und YggG im
Periplasma von *E. coli***

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie und Geografie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Christiane Lütticke

aus Marl
September 2010

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. R. Hensel
Gutachter: Prof. Dr. M. Ehrmann, Prof. Dr. M. Kaiser
Prüfungsdatum:
25.11.2010

Teile dieser Dissertation sind in folgender Publikation enthalten:

Lütticke C., Weski J., Hauske P., Lewandrowski U., Ehrmann M., „ Characterisation of the novel metalloproteases YfgC and YggG of *E. coli* “ (in Vorbereitung)

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	8
TABELLENVERZEICHNIS	10
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	11
1. EINLEITUNG	14
1.1 <i>E. coli</i> als Versuchsorganismus zur Proteincharakterisierung	14
1.2 Morphologie und Aufbau der Zellwand von <i>Escherichia coli</i>	14
1.3 Sekretionswege von periplasmatischen und Außenmembranproteinen	17
1.4 Die Rolle von Lipoproteinen in der Biogenese von Außenmembranproteinen: Der Bam-Komplex	19
1.5 Die Sekretion von Lipoproteinen: Das Lol-System.....	20
1.6 Proteinqualitätskontrolle in <i>E. coli</i>	23
1.7 Proteasen	23
1.8 Metalloproteasen	24
1.8.1 Katalysemechanismen.....	25
1.8.2 Clan MA.....	27
1.8.3 Clan MM	29
1.8.4 Familie M48.....	29
1.9 Oma1.....	30
1.10 HtpX	31
1.11 YfgC	33
1.12 YggG	34
2. ZIELSETZUNG	36

3. MATERIAL UND METHODEN	37
3.1 Material	37
3.1.1 Bakterienstämme	37
3.1.2 Vektoren und Plasmide	38
3.1.3 Oligonukleotide	39
3.1.4 Antikörper	42
3.1.4.1 Primärantikörper	42
3.1.4.2 Sekundärantikörper	42
3.1.5 Proteine und Enzyme	42
3.1.5.1 Verwendete Enzyme	42
3.1.5.2 Verwendete Proteine	43
3.1.6 Peptide	43
3.1.7 Protein- und Nukleinsäurestandards	44
3.1.8 Komplettsysteme	44
3.1.9 Nährmedien	45
3.1.10 Antibiotika	45
3.1.11 Weitere Medienzusätze	46
3.1.12 Chemikalien	46
3.1.13 Verbrauchsmaterialien	46
3.1.14 Geräte	47
3.1.15 Software	48
3.2 Methoden	49
3.2.1 Molekularbiologische Methoden	49
3.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	49
3.2.1.2 Kolonie-PCR	50
3.2.1.3 Plasmidkonstruktionen	51
3.2.1.4 Oligomutagenese	53
3.2.1.5 CRIM-Plasmid Integration nach Wanner und Haldimann (2001)	54
3.2.1.6 Sequenzierung	56
3.2.1.7 RNA-Isolation	56
3.2.1.8 cDNA-Synthese	57
3.2.1.9 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	57
3.2.1.10 <i>E.coli</i> -Genome-Array (Affimetrix)	59
3.2.2 Mikrobiologische Methoden	60

3.2.2.1 Sterilisation.....	60
3.2.2.2 Anzucht von <i>E. coli</i>	60
3.2.2.3 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen	60
3.2.2.4 Stichagartest	60
3.2.2.5 Schwärmassay	60
3.2.3 Proteinbiochemische Methoden	61
3.2.3.1 Gesamtproteinisolierung aus <i>E. coli</i>	61
3.2.3.2 Acetonfällung von Proteinen.....	61
3.2.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung	61
3.2.3.4 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese	61
3.2.3.5 Coomassie-Färbung.....	63
3.2.3.6 Silberfärbung.....	63
3.2.3.7 Western Immunoblotanalyse	64
3.2.3.8 β -Galaktosidase-Assay.....	65
3.2.3.9 Kalter osmotischer Schock	67
3.2.3.10 Membranpräparation	68
3.2.3.11 Reinigung von YfgC mit His-Tag	69
3.2.3.12 Reinigung von YggG mit His-Tag	70
3.2.3.13 Gelfiltration	71
3.2.3.14 Cross-Link Methode	71
3.2.3.15 Abbau von Peptiden und Proteinen	72
3.2.3.16 Zymogramm	72
3.2.3.17 Co-Immunpräzipitation (Co-IP).....	73
3.2.3.18 Massenspektrometrische Analysen	74

4. ERGEBNISSE

4.1 Die Metalloprotease YfgC.....	75
4.1.1 Reinigung von YfgC	75
4.1.2 In vitro Charakterisierung	78
4.1.2.1 Oligomerisierung von YfgC	78
4.1.2.2 Substratsuche	79
4.1.3 In vivo Charakterisierung	80
4.1.3.1 Nachweis von YfgC im Periplasma.....	80
4.1.3.2 β -Galaktosidaseassay	81
4.1.3.3 Mikroskopie von auffälligen <i>yfgC</i> Deletionsstämmen	82
4.1.3.4 Komplementationsassay	84

4.1.3.5 LamB-YfgC Interaktion	85
4.1.3.6 Co-Immunpräzipitation von LamB	86
4.1.3.7 Nachweis von LptD als potentielles Substrat	87
4.1.3.8 Substratidentifizierung in der Außenmembranfraktion	88
4.1.3.9 Kontrolle der LolA-Konzentration	90
4.1.4 Crosslink von YggG und YfgC	91
4.1.5 Co-Immunpräzipitation YggG-YfgC	92
4.2 Die Metalloprotease YggG	93
4.2.1 Reinigung von YggG	93
4.2.2 <i>In vitro</i> Charakterisierung	94
4.2.2.1 Oligomerisierung von YggG	94
4.2.2.2 Crosslink von YggG	95
4.2.3 Substratsuche und -analyse <i>in vitro</i>	95
4.2.3.1 Casein-Zymogramm	96
4.2.3.2 Gesamtcaseinverdau	96
4.2.3.3 β -Caseinverdau	97
4.2.3.4 α -Caseinverdau	98
4.2.3.5 Oligomerisierungsanalyse von α -Casein + YggG	98
4.2.3.6 Massenspektrometrische Analyse des α -Caseinhydrolysats	100
4.2.3.7 Peptidanalyse	102
4.2.3.8 Zeitverlauf der Peptidhydrolyse	104
4.2.3.9 pH-Reihe	105
4.2.3.10 Salzreihe	106
4.2.3.11 Pufferkonzentrationen	108
4.2.3.12 Einfluss von ZnCl_2 auf die Aktivität von YggG	109
4.2.3.13 Optimierte Pufferbedingungen für die Aktivität von YggG	110
4.2.4 Charakterisierung der Disulfidbrücke von YggG	111
4.2.4.1 Untersuchung der DsbA-Abhängigkeit	111
4.2.4.2 Untersuchung des Einflusses der Disulfidbrücke auf die Struktur von YggG	112
4.2.4.3 Abbau von YggG mit und ohne DTT durch DegP	114
4.2.4.4 Einfluss der Disulfidbrücke auf die Aktivität von YggG	115
4.2.5 <i>In vivo</i> Charakterisierung	117
4.2.5.1 Nachweis von YggG in der Außenmembran	117
4.2.5.2 Co-Immunpräzipitation zur <i>in vivo</i> Substratsuche	118
4.2.5.3 β -Galaktosidaseassay	119

4.3 <i>E.coli</i>-Genome-Arrays	122
4.3.1 qRT-PCR	125
4.3.2 Stichagartest	129
4.3.3 Schwärmassays	130
5. DISKUSSION	133
5.1 Charakterisierung von YfgC und YggG, putative Metalloproteasen in der Zellhülle von <i>E. coli</i>	133
5.2 Die Metalloprotease YfgC	133
5.2.1 YfgC ist ein periplasmatisches Protein mit potentieller Protease- und Chaperonfunktion	133
5.2.2 Die Beteiligung von YfgC in der Biogenese von Außenmembranproteinen	135
5.2.3 Stellt YfgC ein Chaperon von Lipoproteinen dar?	138
5.3 Die Metalloprotease YggG	140
5.3.1 YggG ist ein Lipoprotein mit spezifischer Proteasefunktion	140
5.3.2 YggG besitzt eine Disulfidbrücke	143
5.3.3 YggG liegt <i>in vitro</i> hauptsächlich als Monomer vor	144
5.3.4 Eine hohe Expression von aktiven YggG besitzt Einfluss auf die Flagellensynthese	145
5.3.5 Potentielle Interaktionspartner oder Substrate von YggG	148
5.4 Ausblick	149
6. ZUSAMMENFASSUNG	151
7. LITERATUR	154
8. ANHANG	163
DANKSAGUNG	170
LEBENS LAUF	171
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	172
ANGABEN ZUR PRÜFUNG	173

Abbildungsverzeichnis

Abb.1-1: Schematische Darstellung der Zellwand gramnegativer Bakterien	15
Abb.1-2: Struktur des Lipopolysaccharids	16
Abb. 1-3: Translokation durch den Sec-Komplex.....	18
Abb. 1-4: Transport von Membranproteinen mit β -Fasstruktur	19
Abb. 1-5: Modifizierung des N-Terminus von Lipoproteinen	21
Abb. 1-6: Lol-System.....	22
Abb. 1-7: Katalysemechanismus mit einem Zinkkation.....	25
Abb. 1-8: Katalysemechanismus mit einem zusätzlichen co-katalytischem Zink.....	26
Abb. 1-9: Struktur von Thermolysin	28
Abb. 1-10: Alignment des HEXXH-Motiv	31
Abb. 1-11: Aminosäuresequenz von YfgC.....	33
Abb. 1-12: Modell von YfgC.....	34
Abb. 1-13: Modell von YggG	35
Abb. 3-1: Plasmidkarte <i>yfgC</i> in pCS19: pCL2	52
Abb. 3-2: Plasmidkarte <i>yggG</i> in pCS19: pCL4.....	52
Abb. 3-3: Plasmidkarte <i>yggG</i> in pASK-IBA2: pYggG	53
Abb. 4-1: UV-Spektrum des Ni-NTA-Laufs	75
Abb. 4-2: Reinigung von YfgC über Ni-NTA	76
Abb. 4-3: UV-Spektrum des HAPS-Laufs	76
Abb. 4-4: Reinigung von YfgC über HAPS	77
Abb. 4-5: Western Blot der YfgC Reinigung	77
Abb. 4-6: Gelfiltration von gereinigtem YfgC.....	78
Abb. 4-7: Western Blot YfgC-Nachweis.....	80
Abb. 4-8: Promotorstärke von <i>lacZ</i> -Fusionen	81
Abb. 4-9: Promotoraktivität von <i>yfgC</i> unter verschiedenen Wachstumsbedingungen	82
Abb. 4-10: Wachstum des <i>surA yfgC</i> Deletionsstamms bei 42°C	83
Abb. 4-11: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Wildtyp und Deletionsstämmen bei 42°C	83
Abb. 4-12: LamB-Faltungsintermediate im <i>degP yfgC</i> Stamm.....	85
Abb. 4-13: Western Blot der Co-Immunpräzipitation von LamB.....	86
Abb. 4-14: Nachweis von LptD	87
Abb. 4-15: Silbergel der Außenmembrananalyse	88
Abb. 4-16: Western Blot zur YggG Detektion	89
Abb. 4-17: Western Blot zur LolA Detektion	90
Abb. 4-18: Silbergel des YfgC-YggG Crosslinks.....	91
Abb. 4-19: Western Blot zur Detektion von YfgC	91
Abb. 4-20: Co-Immunpräzipitation von YfgC	92
Abb. 4-21: Reinigung von YggG.....	93
Abb. 4-22: Gelfiltration von gereinigtem YggG	94
Abb. 4-23: Silbergel des YggG-Crosslinks.....	95

Abb. 4-24: Casein-Zymogramm	96
Abb. 4-25: Silbergel der Caseinproteolyse	96
Abb. 4-26: Proteolyseansatz von β -Casein.....	97
Abb. 4-27: α -Caseinabbau	98
Abb. 4-28: Gelfiltration von α -Casein + YggG	99
Abb. 4-29: α -Caseinhydrolysate für die MS	100
Abb. 4-30: Schnittmuster von YggG in α -Casein und dephosphoryliertem α -Casein	101
Abb. 4-31: Proteolyse verschiedener Peptide.....	103
Abb. 4-32: UV-Spektren von EVLNENLLRFFV und VLNENLLRFFVAPFP	103
Abb. 4-33: Zeitreihe der Peptidhydrolyse durch YggG.....	104
Abb. 4-34: Spektrum der Peptidproteolyse	104
Abb. 4-35: pH-Reihe α -Caseinverdau	105
Abb. 4-36: pH-Abhängigkeit der Peptidproteolyse durch YggG	106
Abb. 4-37: Coomassiegel der Salzsäure	107
Abb. 4-38: Salzsäure des Peptidabbaus	107
Abb. 4-39: Phosphatreihe der Peptidhydrolyse	108
Abb. 4-40: Zinkchloridreihe der Peptidhydrolyse	109
Abb. 4-41: Spektren des EVLNENLLRFFV-Proteolyse in verschiedenen Puffern.....	110
Abb. 4-42: Sequenzvergleich von YggG.....	111
Abb. 4-43: Western Blot des Disulfidbrückennachweis in YggG	112
Abb. 4-44: Gelfiltration von YggG in Gegenwart von DTT	113
Abb. 4-45: Crosslink von reduziertem (+ DTT) und oxidiertem (- DTT) YggG	114
Abb. 4-46: Abbau von YggG durch DegP	114
Abb. 4-47: α -Caseinabbau durch YggG mit und ohne DTT	115
Abb. 4-48: Spektren der EVLNENLLRFFV-Proteolyse.	116
Abb. 4-49: Western Blot YggG Nachweis	117
Abb. 4-50: Co-Immunpräzipitation zur Substratsuche von YggG	118
Abb. 4-51: Promotorstärken von <i>lacZ</i> -Fusionen	119
Abb. 4-52: Promotoraktivität von <i>yggG</i> unter verschiedenen Wachstumsbedingungen ..	120
Abb. 4-53: Western Blot zur Ermittlung des YggG-Gehalts	121
Abb. 4-54: Genexpression in dem <i>yggG</i> Deletionsstamm und <i>yggG</i> Deletionsstamm + pCL4	123
Abb. 4-55: Genexpression in dem <i>yfgC</i> Deletionsstamm und <i>yfgC</i> Deletionsstamm + pCL2	124
Abb. 4-56: Relative Expression von <i>flhC</i>	125
Abb. 4-57: Relative Expression von <i>flhD</i>	126
Abb. 4-58: Relative Expression von <i>fliD</i>	127
Abb. 4-59: Relative Expression von <i>fliM</i>	127
Abb. 4-60: Relative Expression von <i>motA</i>	128
Abb. 4-61: Stichagartest.....	129
Abb. 4-62: Schwärmsassay.....	130
Abb. 4-63: Western Blot zur Kontrolle der Induktion	131
Abb. 4-64: Schwärmsassay im <i>rscB</i> Deletionsstamm.....	132
Abb. 5-1: YfgC-Modell dargestellt mit PyMol	134

Abb. 5-2: Model für die Funktion von SurA im Periplasma.....	137
Abb. 5-3: Modell YggG Transport zur Außenmembran bei 42°C und hoher Osmolarität im Wildtypstamm	139
Abb. 5-4: Modell YggG Transport zur Außenmembran bei 42°C und hoher Osmolarität im <i>yfgC</i> Deletionsstamm.....	139
Abb. 5-4: YggG-Modell dargestellt mit PyMol	143
Abb. 5-5: Die Übergangsphasen der Flagellensynthese	146
Abb. 5-6: Modell des Rcs-Weges mit potentieller Funktion von YggG	148

Tabellenverzeichnis

Tab. 3-1: Bakterienstämme	37
Tab. 3-2: Vektoren und Plasmide	38
Tab. 3-3: Oligonukleotide	39
Tab. 3-4: Primärantikörper	42
Tab. 3-5: Sekundärantikörper.....	42
Tab. 3-6: Enzyme.....	42
Tab. 3-7: Proteine	43
Tab. 3-8: Peptide.....	43
Tab. 3-9: Protein- und Nukleinsäurestandards	44
Tab. 3-10: Komplettsysteme.....	44
Tab. 3-11: Antibiotika	45
Tab. 3-12: CRIM-Plasmid Integration	56
Tab. 3-13: Zusammensetzung für Polyacrylamidgele	62
Tab. 4-1: pNA (p-Nitroanilin)-Substrate	79
Tab. 4-2: Wachstum der Stämme mit und ohne Vektor bzw. Plasmid	84
Tab. 4-3: Ergebnisse der Außenmembrananalyse	88
Tab. 4-4: Getestete Peptide	102
Tab. 4-5: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse	118
Tab. 4-6: Ergebnisse der Schwärmassays in cm.....	131

Abkürzungsverzeichnis

A ₆₀₀	Absorptionsänderung bei 600 nm
α	alpha
A	Ampere
Abb.	Abbildung
A. dest	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosindtriphosphat
β	beta
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
Da, kDa	Dalton, Kilo-Dalton
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynucleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	Fast protein liquid chromatography
g	Gramm; Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
His	Histidin
HPLC	High performance liquid chromatography

IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
k	Kilo (10^3)
kb	Kilobasen
KO	Knockoutstamm
Lac	Lactose
λ	Lambda
L	Liter
m	Milli (10^{-3})
μ	Mikro (10^{-6})
min	Minute
M	Molar
MS	Massenspektrometrie
n	Nano (10^{-9})
NBT	Nitroblautetrazolium
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
Ni-TED	Nickel-tris-carboxymethylethylendiamin
nt	Nukleotid
N-Terminus	Amino-Terminus
NZA	NZ-Amin
OD	optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pNA	p-Nitroanilin
%	Prozent
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> -PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
σ	Sigma
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _M	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
U	Unit
üN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
W	Watt
Wt	Wildtyp

Aminosäuren

Aminosäuren werden entsprechend der IUPAC-Nomenklatur im Ein- oder Dreibuchstaben-code angegeben.

1. Einleitung

1.1 *E. coli* als Versuchsorganismus zur Proteincharakterisierung

Escherichia coli (*E. coli*) wurde 1885 von dem Kinderarzt Theodor Escherich entdeckt (Oberbauer, 1992). Als natürlichen Lebensraum besiedelt das Bakterium die Darmwand von homoiothermen Lebewesen und ist dort in Prozessen wie z.B. die Vitaminsynthese involviert. Pathogene Stämme von *E. coli* können jedoch Diarrhöe und Urogenital-Infektionen verursachen, was das Bakterium für die medizinische Forschung interessant macht. Aufgrund der problemlosen Kultivierung und schnellen Zellteilung eignet sich *E. coli* auch hervorragend als Versuchsorganismus in der Grundlagenforschung. Die Mikrobiologie nutzt den apathogenen Wildtypstamm K12 schon lange als Modellorganismus zur Erforschung verschiedener genetischer, biochemischer und physiologischer Mechanismen. Dazu gehört auch die Untersuchung uncharakterisierter Proteine. Von denen einige, aufgrund von homologen Sequenzen zu Stressproteasen, höchstwahrscheinlich an der Proteinqualitätskontrolle beteiligt sind. Deren Erforschung ist auch interessant um Rückschlüsse auf humane Homologe zu ziehen. So ist z.B. die prokaryotische Serinprotease DegP ein Schlüsselement in der Proteinqualitätskontrolle im Periplasma von *E. coli* (Spiess *et al.*, 1999). Das humane Homolog HtrA1 (high temperature requirement) ist in Krankheiten wie Krebs (Baldi *et al.*, 2002; Baldi *et al.*, 2008; Chien *et al.*, 2009), Alzheimer (Grau *et al.*, 2005) und Arthritis (Hu *et al.*, 1998; Tsuchiya *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2007b) involviert. Beide Proteine sind damit potentielle `Targets` für die Medizin und Pharmaindustrie.

1.2 Morphologie und Aufbau der Zellwand von *Escherichia coli*

E. coli gehört zur Gattung der Enterobacteriaceae. Zu dieser Kategorie gehören gramnegative, stäbchenförmige Bakterien, die fakultativ anaerob sind. *E. coli* besitzt eine peritriche Begeißelung, durch die es sich fortbewegen kann.

Im Inneren des Bakteriums befindet sich das Cytoplasma. Dieses beinhaltet das Nucleoid, welches das genetische Material der Zelle darstellt, und die Ribosomen, an denen die Proteinbiosynthese stattfindet. Das Cytoplasma wird von der Cytoplasmamembran, auch Innenmembran genannt, begrenzt, welche als Permeabilitätsbarriere den Übergang zur Zellhülle darstellt.

Während Gram positive Bakterien eine durchgehende Zellwand besitzen, weisen Gram negative Bakterien eine Innen- und eine Außenmembran mit einem Zwischenraum, dem so genannten Periplasma, auf (siehe Abb.1-1).

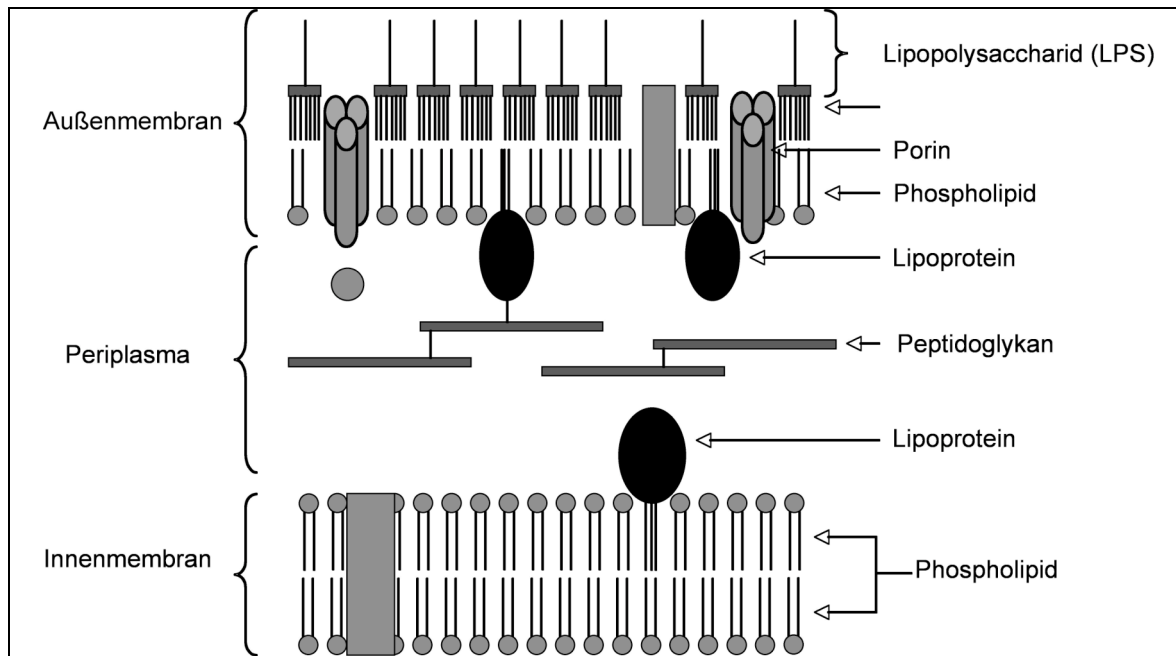


Abb.1-1: Schematische Darstellung der Zellwand gramnegativer Bakterien (Tokuda *et al.* 2004, modifiziert)

Teil des Periplasmas ist die Peptidoglykanschicht, welche der Zelle Form und Festigkeit gibt und sie vor osmotischen Stress schützt. Diese Schicht besteht aus 1,4 β -glykosidisch verknüpften Zuckerderivaten (N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure) und quervernetzten Aminosäuren. Während bei grampositiven Bakterien der Peptidoglykananteil 90% ausmacht, sind es bei gramnegativen Zellen nur ca. 10%. Der periplasmatische Raum nimmt 30% des Zellvolumens ein und ist ca. 50 nm dick (Wülfing und Plückthun, 1994), wobei dies je nach Osmolarität variiert. Im Periplasma sind ca. 150 verschiedene Proteine enthalten (Blattner *et al.*, 1997), dabei wird die größte Klasse durch die ABC-Transporter gebildet. Des Weiteren finden sich im Periplasma Proteasen, Chaperone und Faltungs-Katalysatoren (z.B. Prolin-Isomerasen). Die periplasmatischen Proteine sind außerdem in Stoffwechselwege, Regulationsmechanismen, Virulenz, Motilität, sowie die Stressantwort und der Membranbiogenese involviert.

Der periplasmatische Raum ist durch die Außenmembran zum umgebenden Milieu abgegrenzt. Sowohl die Innen- als auch die Außenmembran besteht aus Phospholipiden (siehe Abb.1-1). Im Gegensatz zur Innenmembran ist die Außenmembran jedoch asymmetrisch aufgebaut.

Dabei sind die Phospholipide dem periplasmatischen Raum zugewandt, während eine Lipopolysaccharidschicht nach außen gerichtet ist (Mühlradt *et al.* 1975).

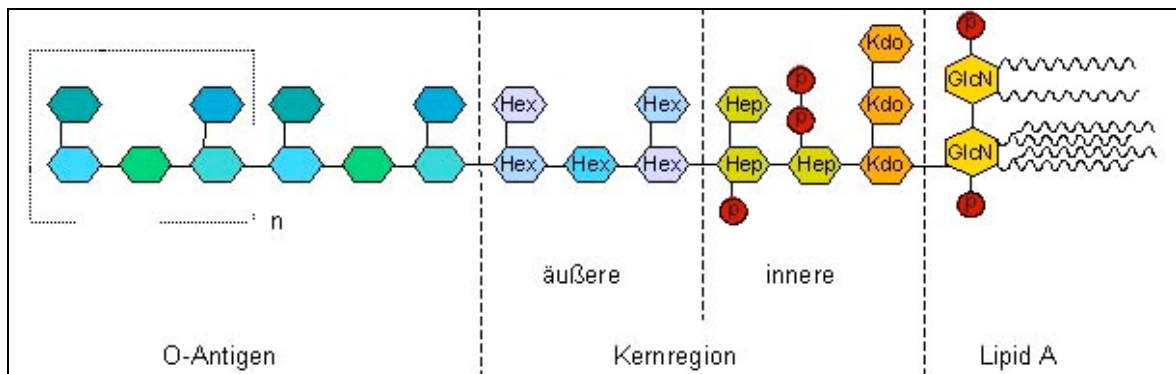


Abb.1-2: Struktur des Lipopolysaccharids (Alexander und Rietschel 2001, modifiziert)

Lipopolysaccharide (siehe Abb.1-2) bestehen aus drei Untereinheiten: 1. Dem Lipid A, bei dem Fettsäuren über Esteraminbindungen mit einem Disaccharid verknüpft sind, 2. Der Kernregion, diese besteht aus verschiedenen Oligosacchariden und 3. Dem O-Antigen, ein komplexes Polysaccharid, das aus sich wiederholenden Oligosacchariden besteht und in der Länge variiert.

Die Außenmembran fungiert als Permeabilitätsbarriere für hydrophobe Substanzen (Nikaido und Vaara, 1985; Nikaido *et al.*, 2003) und ist durchlässig für kleine Moleküle bis ca. 600 kDa. In der Membran sind verschiedene Proteinspezies eingebettet oder verankert, dazu gehören Porine und Komponenten von Export-Maschinen. Sie sind dabei an der Aufnahme von Nährstoffen bzw. Sekretion von Proteinen oder Toxinen beteiligt. Bei anderen Außenmembranproteinen handelt es sich um Proteasen, Lipasen und Glucosidasen. Einige Beispiele für die oben genannten Proteine sind OmpA, OmpC, OmpF, LamB und PhoE. Ein gemeinsames Strukturmerkmal der Außenmembranproteine ist die β -Fasstruktur, die durch amphipathische β -Faltblätter entsteht, welche die Membran durchspannen (Koronakis *et al.*, 2001; Andersen *et al.*, 2001; Schulz *et al.*, 2002). Im Gegensatz zur Außenmembran weisen die Proteine der Innenmembran Transmembransegmente mit α -helikaler Struktur auf.

Eine weitere wichtige Proteinklasse in der Außenmembran stellen die Lipoproteine dar. Einige Lipoproteine stellen die Verbindung zwischen Peptidoglykanschicht und der Außenmembran her. Insgesamt besitzt *E. coli* jedoch 90 Arten von Lipoproteinen (Tokuda *et al.*, 2004) von denen nur ca. 10 in der Innenmembran lokalisiert sind. Der Großteil dieser Lipoproteine befindet sich jedoch an der periplasmatischen Seite der Außenmembran.

Alle Proteine werden im Cytoplasma exprimiert und müssen, um ins Periplasma und in die Außenmembran zu gelangen, die Innenmembran passieren. Abhängig von der Proteinspezies erfolgt dies über unterschiedliche Sekretionsapparate der Innenmembran.

1.3 Sekretionswege von periplasmatischen und Außenmembranproteinen

Es existieren zwei Sekretionssysteme über die Proteine aus dem Cytoplasma ins Periplasma transloziert werden können. Über den Twin Arginin Translokations-Weg (TAT) werden bereits im Cytoplasma gefaltete Proteine transportiert. Im Durchschnitt gelangen 30 Proteine über diesen Weg in den periplasmatischen Raum. Ein Großteil der Proteine mit Signalsequenz (ca. 500) wird durch das Sec-System in die Zellhülle transloziert. Die Initiierung der Sekretion und Differenzierung der Sekretionssysteme erfolgt durch die Signalsequenz. Diese besteht aus drei Untereinheiten, die positiv geladene N-terminale Region, die H-Region (ein hydrophober Kern) und einem polaren C-terminalen Abschnitt. Die H-Region der TAT-Signalsequenzen ist weniger hydrophob und durchschnittlich etwas länger als die der Sec-Signalsequenzen (Lee *et al.*, 2006).

Das Sec-Translokon (siehe Abb. 1-3) ist ein Protein-Komplex in der Innenmembran (IM), der sich aus mehreren Untereinheiten zusammensetzt. Er besteht aus den zwei trimeren, membrandurchspannenden Komplexen SecYEG und SecDF-YajC, dem Innenmembranprotein YidC und dem peripher assoziierten, ATP-abhängigen SecA, welches die Motordomäne des Sec-Translokons repräsentiert. Eine weitere wichtige Komponente bei der Translokation ist die SPase, eine membrangebundene Peptidase auf der periplasmatischen Seite der Innenmembran, die die Signalsequenz des Vorläuferproteins abspaltet.

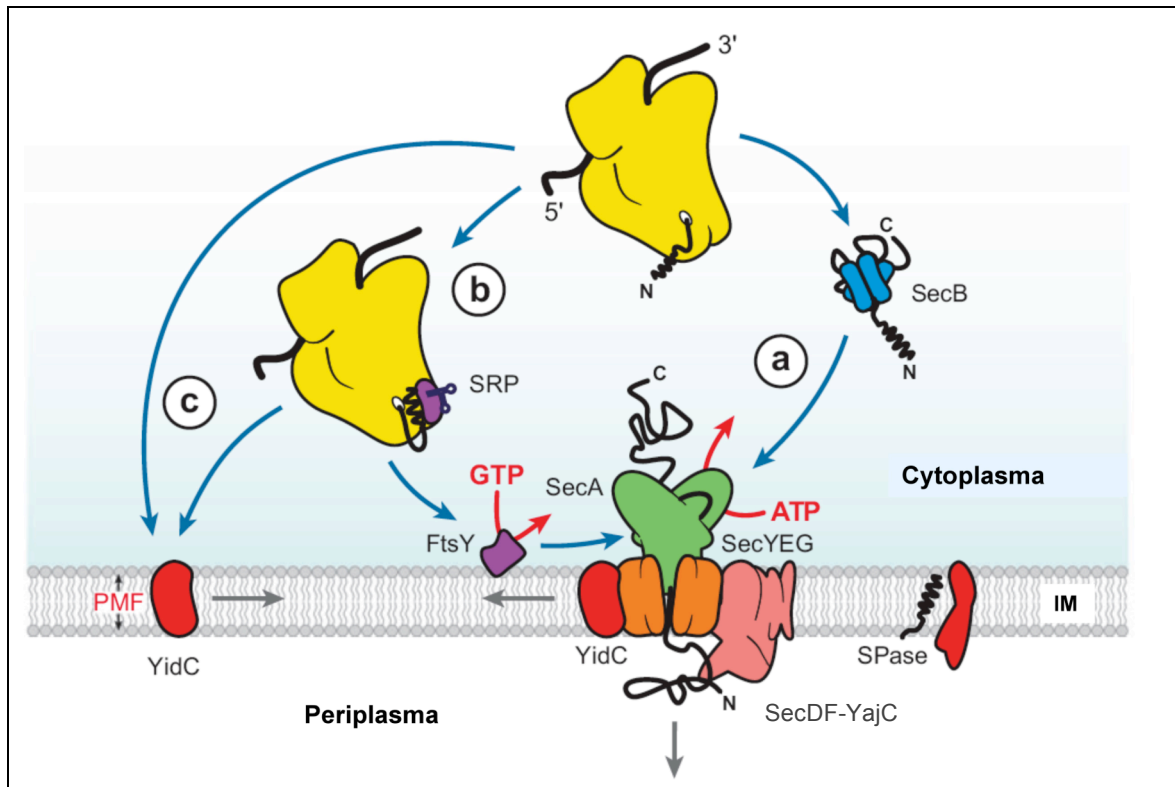


Abb. 1-3: Translokation durch den Sec-Komplex (Driessen, 2008, modifiziert)

Die Sekretion durch das Sec-System kann unterschiedlich ablaufen (siehe Abb. 1-3). Entweder assoziieren die Vorläuferproteine im Cytoplasma posttranslational direkt an SecA oder sie werden durch das Chaperon SecB zu SecA eskortiert (a). SecB kann die Sekretionseffizienz (Baars, 2006) erhöhen, indem es den ungefalteten Zustand der Präproteine erhält.

Einige Vorläuferproteine, vor allem Innenmembranproteine, werden co-translational durch den 'signal recognition particle' (SRP) (b) und den SRP-Rezeptor FtsY an SecA weitergeleitet. Die Sekretion erfolgt, indem SecA das Präprotein mit der Signalsequenz voraus in den SecYEG-Komplex transferiert. Die Energie für diesen Prozess wird aus der Hydrolyse von ATP durch SecA und zusätzlich durch die protonenmotorische Kraft gewonnen (Duong, 1997; Sharyn, 2007).

Membranproteine können mit Hilfe von YidC in die Innenmembran integriert werden (Luirink J, 2005; van der Laan, 2005). Die Insertion erfolgt entweder direkt durch YidC (c) oder in Kooperation mit dem SecYEG-Komplex.

1.4 Die Rolle von Lipoproteinen in der Biogenese von Außenmembranproteinen: Der Bam-Komplex

Nach der Translokation der Präproteine durch die Innenmembran gibt es verschiedene Systeme, abhängig von der Proteinspezies, welche die Proteine an ihren eigentlichen Bestimmungsort befördern. Oft sind in diese Systeme Lipoproteine involviert die dabei wichtige Funktionen übernehmen.

Der Bam-Komplex ist an der Integration von Proteinen mit β -Fasstruktur in die Außenmembran beteiligt (Abb. 1-4).

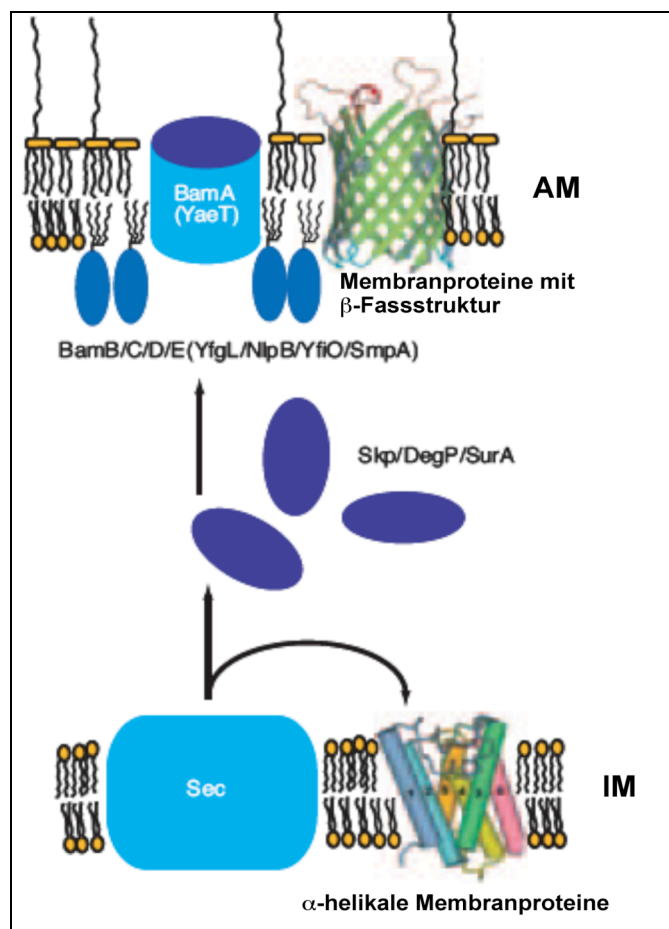


Abb. 1-4: Transport von Membranproteinen mit β -Fasstruktur (Tokuda, 2009, modifiziert)

Nach der Sekretion *via* Sec-System ins Periplasma und Abspaltung der Signalsequenz, werden die Proteine u.a. mittels der periplasmatischen Chaperone Skp, DegP und SurA zur Außenmembran eskortiert. Die Chaperone verhindern dabei eine Fehlfaltung oder Aggregation ihrer Substrate (Vertommen, 2009). Die Integration in die Außenmembran erfolgt durch den Bam-Komplex, mit einem bisher noch weitestgehend ungeklärten Mechanismus (Bos, 2007a). Dieser Komplex besteht aus BamA (YaeT) und den vier

Lipoproteinen BamB (YfgL), BamC (NlpB), BamD (YfiO) und BamE (SmpA). BamA bindet wahrscheinlich den C-Terminus des zu integrierenden Proteins über periplasmatische POTRA (polypeptide transport associated) Domänen (Robert, 2006). BamA und BamD sind essentiell, eine Deletion dieser Proteine hat eine Fehlintegration verschiedener Außenmembranproteine, wie TolC, OmpC, OmpF und OmpA zur Folge (Wu, 2005; Malinverni, 2006). Eine Deletion der Proteine BamB, BamC und BamE ist für die Zelle zwar nicht letal führt aber ebenfalls zu Defekten bei der Membranintegration (Ruiz, 2005; Malinverni 2006). BamD und auch BamE sind an der Stabilisation und Funktion des Bam-Komplexes beteiligt (Sklar, 2007). Somit sind die Lipoproteine des Bam-Systems relevante Elemente bei der Integration von Außenmembranproteinen.

1.5 Die Sekretion von Lipoproteinen: Das Lol-System

Lipoproteine gelangen über einen eigenen Transportweg, dem Lol-System, in die Außenmembran. Zur Erkennung durch dieses System werden Lipoproteine als Präproteine mit einem Signalpeptid synthetisiert, welches eine Konsensussequenz, die so genannte `Lipobox` Leu-(Ala/Ser)-(Gly/Ala)-Cys enthält (Hayashi und Wu, 1990). Die Membranverankerung von Lipoproteinen erfolgt über N-Acyl-diacylglycerolcysteine. Nach dem Transport durch den Sec-Komplex, wird der N-Terminus der Lipoproteine noch innerhalb der Membran prozessiert. Die Modifizierung des N-Terminus wird schrittweise durch die drei Enzyme Lgt, LspA und Lnt katalysiert (siehe Abb. 1-5).

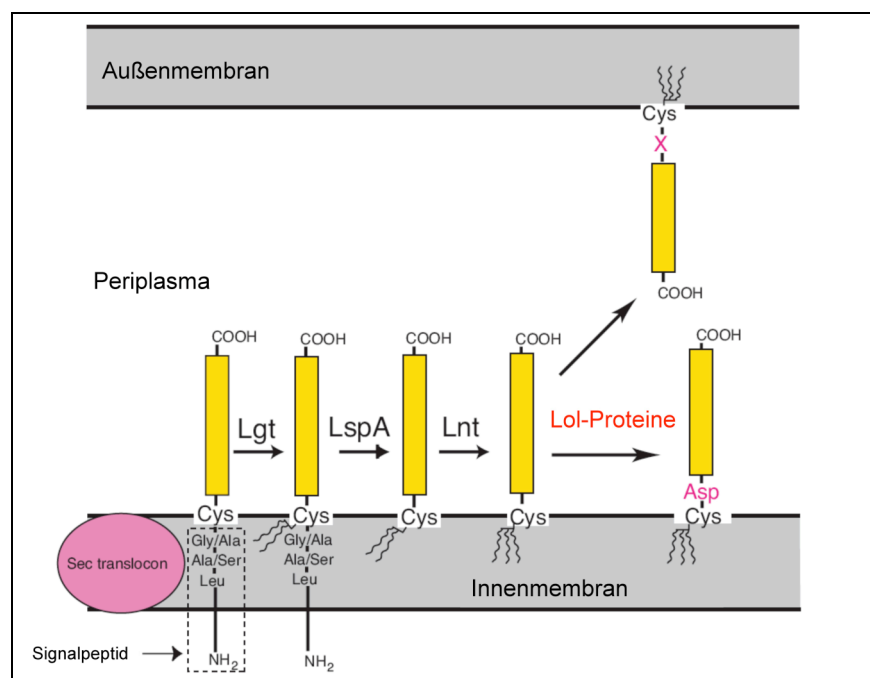


Abb. 1-5: Modifizierung des N-Terminus von Lipoproteinen (Tokuda, 2009, modifiziert)

Im ersten Schritt bildet Lgt zwischen der Sulfhydryl-Gruppe des N-terminalen Cysteins und einem Diacylglycerol eine Thioetherbindung aus. In einem zweiten Schritt spaltet LspA das Signalpeptid ab. Zuletzt katalysiert Lnt eine Aminoacylierung des N-terminalen Cysteins. Das so gebildete Lipoprotein besitzt am Cystein drei Acylketten über die es in der Zielmembran verankert wird.

Lipoproteine sind entweder an der periplasmatischen Seite der Innenmembran oder in der Außenmembran verankert. Die Lokalisation der Lipoproteine ist durch das 'Lipoprotein-Sortierungs-Signal' festgelegt. Dabei ist die zweite Aminosäure nach dem acylierten Cystein relevant. Befindet sich an dieser Position ein Aspartat verbleibt das Lipoprotein in der Innenmembran, indem es einen Komplex mit Phosphatidylethanolaminen bildet und die Erkennung durch das Lol-System inhibiert. Wenn anstelle des Aspartats eine andere Aminosäure vorkommt, wird das Lipoprotein zur Außenmembran transferiert.

Die Translokation von Lipoproteinen erfolgt durch das Lol-System. Dieses besteht aus dem ABC-Transporter-Komplex LolCDE, dem periplasmatischen Chaperon LolA sowie dem Außenmembranrezeptor und Lipoprotein LolB (Matsuyama, 1997). Der LolCDE-Komplex setzt sich in einer Stöchiometrie 1:2:1 aus LolC, LolD und LolE zusammen und besitzt eine ATPase-Funktion (Yakushi, 2000). LolC und LolE sind in die Innenmembran integriert, indem sie diese je viermal durchspannen. Die ATPase LolD ist peripher an der cytoplasmatischen Seite der Innenmembran assoziiert. LolA ist ein Lipoprotein-spezifisches Chaperon, welches den hydrophoben N-Terminus von Lipoproteinen im Verhältnis 1:1 bindet und so einen hydrophilen Komplex bildet. LolA ist essentiell für das Wachstum der Zelle (Tajima *et al.*, 1998), es besitzt eine β -Fassstruktur, deren Zugang durch drei Helices reguliert wird (Takeda *et al.*, 2003). Zusammen bilden sie so eine hydrophobe Höhle, welche die N-terminalen Acylketten des Lipoproteins bindet. Die hydrophobe Höhle wird, zur Aufnahme von Lipoproteinen, durch eine Konformationsänderung der Helices geöffnet und nach Freisetzung dieser wieder geschlossen. Die Tertiärstrukturen von LolA und LolB sind sehr ähnlich, obwohl die Sequenzübereinstimmung nur sehr gering ist. Während bei LolA die hydrophobe Höhle zum größten Teil aus aromatischen Resten besteht, setzt sie sich bei LolB hauptsächlich aus Leucin und Isoleucin zusammen (Takeda *et al.*, 2003). LolB ist als Lipoprotein über einen Lipidanker in der Außenmembran lokalisiert. Eine Deletion von LolB ist für die Zellen letal (Tanaka *et al.*, 2001).

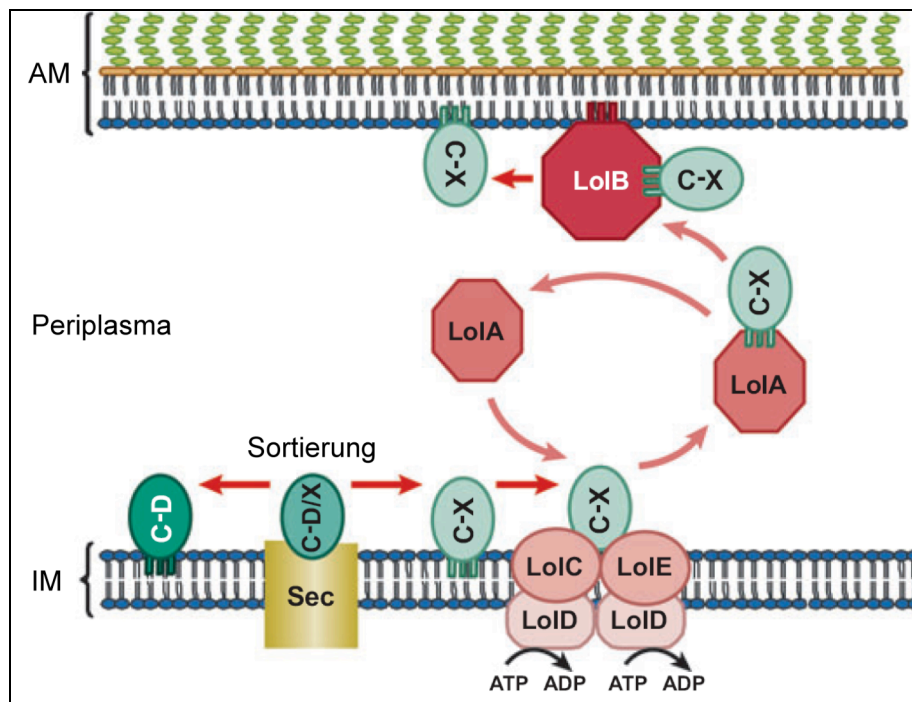


Abb. 1-6: Lol-System (Bos, 2007b, modifiziert)

Nach dem Transport durch das Sec-System und der Acylierung des N-terminalen Cysteins, binden alle Lipoproteine mit einer anderen Aminosäure als Aspartat an Position 2 an den LolCDE-Komplex (Abb. 1-6). Diese Bindung erfolgt ATP-unabhängig und erhöht gleichzeitig die Affinität von LoID für ATP. Die Bindung des ATP an LoID führt dabei zu einer Konformationsänderung von LolC/E, welche eine Abnahme der Lipoproteinbindungsaffinität zur Folge hat. Der LolCDE-Komplex initiiert die Freisetzung des Lipoproteins. Die Hydrolyse von ATP durch LoID liefert dabei die Energie, die für den Transfer des Lipoproteins von LolC/E zum periplasmatischen LolA benötigt wird (Ito *et al.*, 2006). LolA bindet den hydrophoben N-Terminus des Lipoproteins und der so entstandene hydrophile LolA-Lipoprotein-Komplex gelangt durch das Periplasma zur Außenmembran. Dort transferiert LolA das Lipoprotein zu LolB. Dieser Transfer verläuft ohne Energie und wird vermutlich nur durch die Affinitätsunterschiede von LolA und LolB für Lipoproteine angetrieben (Matsuyama *et al.*, 1997). LolB leitet das Protein an die Außenmembran weiter, in die es dann über den lipophilen N-Terminus verankert wird.

1.6 Proteinqualitätskontrolle in *E. coli*

Die Struktur von Proteinen ist schon in ihrer Aminosäuresequenz festgelegt. Die Faltung cytoplasmatischer Proteine erfolgt direkt nach der Translation, während die meisten Proteine mit Signalsequenz erst nach dem Passieren der Innenmembran gefaltet werden. Die Ausbildung der Struktur verläuft dabei weitestgehend spontan, wird aber in vielen Fällen durch Chaperone unterstützt. Chaperone erkennen dabei die hydrophobe Oberfläche ihrer Substrate, die neben ungefalteten Proteinen auch falsch gefaltete Proteine sein können. Chaperone helfen nicht nur bei der Faltung neu synthetisierter Proteine, sondern sorgen durch die Rückfaltung fehlgefalteter Proteine auch dafür, dass diese nicht aggregieren. Im Cytoplasma befinden sich ATP-abhängige Chaperone wie GroEL und GroES, sowie DnaK und DnaJ (Georgopoulos, 2006; Li *et al.*, 2009). Das Periplasma enthält Chaperone wie z.B. Skp (Sklar *et al.*, 2007; Qu *et al.*, 2007), sowie die Prolinisomerasen FkpA und SurA, denen eine zusätzliche Chaperonfunktion nachgewiesen werden konnte (Arié *et al.*, 2001; Rizzitello *et al.*, 2001).

Wenn die Zelle Hitze, Antibiotika, osmotischem Stress oder pH-Wertänderungen ausgesetzt ist, ist die Integrität der Zellhülle zunehmend gefährdet, da sich Proteine vermehrt nicht mehr richtig falten können und aggregieren. In diesem Fall sind nicht nur Chaperone relevant, sondern auch Proteasen, die unter diesen Stressbedingungen erhöht exprimiert werden und fehlgefaltete oder aggregierte Proteine abbauen.

1.7 Proteasen

Proteasen sind Enzyme, die die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren. Sie werden anhand ihrer aktiven Seitenreste oder den Ionen, welche an der Katalyse beteiligt sind, klassifiziert. Zu den Hauptklassen zählen die Serin-, Aspartat-, Cystein- und die Metalloproteasen. Sie besitzen verschiedene Funktionen, zu den wichtigsten gehört die Protektion der Zelle durch die Degradation geschädigter und fehlgefalteter Proteine. Eine weitere relevante Aufgabe ist die Regulation, dazu gehören die Aktivierung und Inaktivierung von Proteinen in Signal-Transduktionskaskaden. Ein Beispiel ist der σ^E -Weg in dem DegS durch einen definierten Schnitt RseA aktiviert (Ruiz und Silhavy, 2005). Zudem sind einige Proteasen an der Nährstoffaufnahme (Digestion) der Zelle beteiligt.

Jeder Zellbereich besitzt seine eigenen proteolytischen Enzyme. Im Periplasma von *E. coli* gibt es 20 Proteasen, neun gehören zu den Serinproteasen, sechs sind Metalloproteasen, drei weitere sind potentielle Cysteinproteasen. Zwei Proteasen sind

unklassifiziert mit unbekanntem Mechanismus. Die Metalloproteasen weisen dabei die größte Divergenz zu den anderen Proteaseklassen auf.

1.8 Metalloproteasen

Metalloproteasen gehören zu den Hydrolasen bei denen der nukleophile Angriff der Peptidbindung durch ein Wassermolekül vermittelt wird. Das Wassermolekül wird dabei durch ein Metallkation aktiviert. Bei den zweiwertigen Metallkationen handelt es sich meistens um Zink, einige Metalloproteasen koordinieren aber auch Mangan, Nickel, Cobalt oder Kupfer in ihrem aktiven Zentrum. Das Metallion wird dabei durch drei Aminosäure-Liganden in Position gehalten.

Metalloproteasen lassen sich anhand der Anzahl ihrer Metallkationen in zwei große Gruppen unterteilen. Zur ersten Gruppe gehören Metalloproteasen die nur mit zwei Metallionen katalytisch aktiv sind. So benötigen z.B. Metalloproteasen mit Cobalt oder Mangan zwei Kationen, es gibt jedoch auch Proteasefamilien in denen zwei Zink-Kationen co-katalytisch vorkommen. Die Gruppe mit zwei Metallkationen beinhaltet unter den bisher beschriebenen Proteasen nur Exopeptidasen. Zur zweiten großen Gruppe gehören alle Metalloproteasen mit nur einem katalytisch wirksamen Kation. Dazu zählen sowohl Proteasen, die ein Nickel-Kation im aktiven Zentrum koordinieren, als auch sehr viele Metalloproteasen mit nur einem Zinkion. Zu dieser Kategorie gehören sowohl Exo- als auch Endopeptidasen.

Die Metallkationen werden durch die Aminosäuren Histidin, Glutamat, Aspartat oder Lysin in Position gehalten. Für die Katalyse ist neben diesen Liganden noch eine weitere Aminosäure wichtig, die den elektrophilen Part übernimmt. In vielen Metalloproteasen ist dies Glutamat (Mock und Stanford, 1996). Die Abstände der Metallliganden weisen in der Aminosäuresequenz ein `kurz-lang`-Muster auf, bei dem die ersten zwei Liganden nah beieinander und der Dritte weiter entfernt ist (Vallee *et al.*). In YggG z.B. sind die beiden Histidine an den Positionen 130 und 134, während der sich dritte Ligand (Glutamat), 49 Aminosäuren weiter, an Stelle 189 befindet.

In einer weiteren Unterteilung werden Metalloproteasen in 16 Clans und 50 Familien die zu diesen Clans gehören, differenziert. Die Unterscheidung erfolgt zum einen anhand des Konsensus-Binde-Motivs, zum anderen durch die Anzahl der katalytisch wirksamen Metallkationen. So besitzen Proteasen der Clans MA, MC, MD, ME, MJ, ML und MM nur ein katalytisch wirksames Kation, welches bis auf Clan ML (Nickel) meistens Zink ist. Dagegen beinhalten die Proteasen der Clans MF, MG, MH und MN co-katalytisch

wirksame Kationen welche z.B. Zink oder Mangan in Clan MF und Cobalt oder Mangan in Clan MG sein können.

1.8.1 Katalysemechanismen

Bei den Metalloproteasen gibt es zwei relevante Katalysemechanismen. Der erste Mechanismus (Abb. 1-7) beinhaltet die katalytischen Reste His His Glu/Asp für die Zinkbindung.

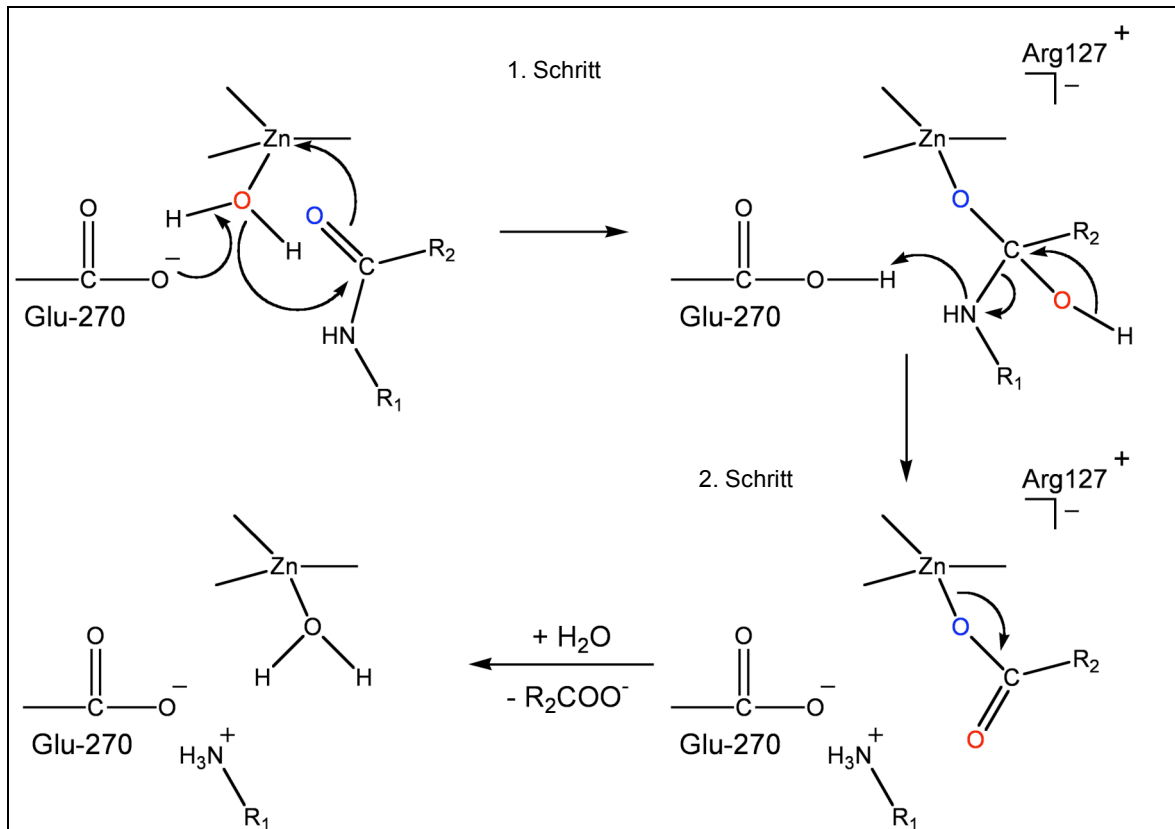


Abb. 1-7: Katalysemechanismus mit einem Zinkkation

1. Schritt: Das am Metall koordinierte Hydroxid greift die Carbonylgruppe des Substratpeptids an. Glu270 katalysiert die Abspaltung des Protons vom am Metall gebundenen Wasser, dabei wird die negative Ladung im Übergangszustand durch Arg127 stabilisiert und das Substrat wird durch andere aktive Seitenreste z.B. Asn144, Arg145 oder Tyr248 fixiert.

2. Schritt: Glu270 katalysiert die Abgabe eines Protons an das abdiffundierende Amin. Der metallgebundene tetraedrische Übergangszustand zerfällt, das N-terminale Produkt wird freigesetzt und Wasser koordiniert wieder am Metall. Da weiterhin eine Bindung zwischen Glu270 und dem C-terminalen Produkt besteht, kann der Enzym-Komplex eine reverse Reaktion vollziehen, also die Synthese einer Peptidbindung.

Der zweite Katalyse-Mechanismus (Abb. 1-8) beinhaltet ein zusätzliches co-katalytisches Zink (bekannt für *Aeromonas proteolytica aminopeptidase* (AAP) und *Streptomyces griseus aminopeptidase* (SGAP))

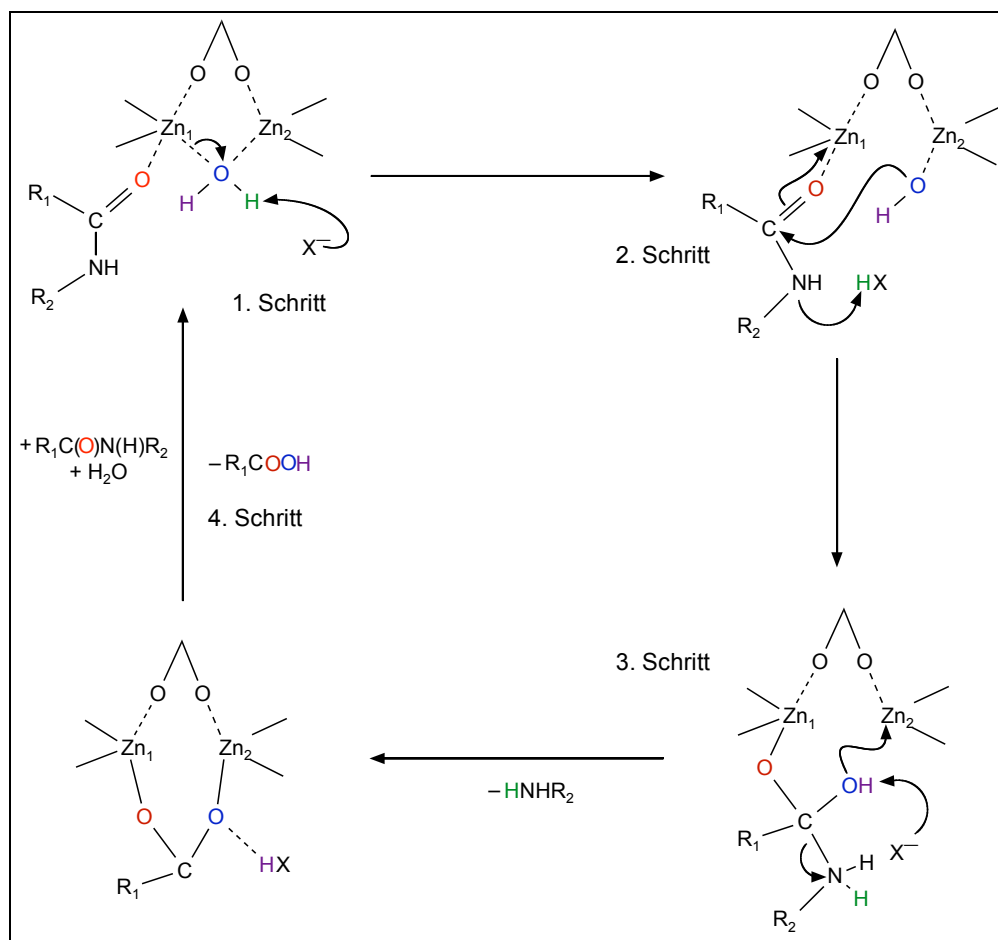


Abb. 1-8: Katalysemechanismus mit einem zusätzlichen co-katalytischem Zink (X steht für Glu 151/Glu 131)

1. Schritt: Zink interagiert mit der Carbonylgruppe des Substratpeptids. Die Aminosäuren Glu151/Glu131 (Nummerierung bei AAP/SGAP) agieren als Basen indem sie ein Proton vom am Zink koordinierten Wasser entfernen.

2. Schritt: Das am Zink koordinierte Hydroxid, das in Schritt 1 entstanden ist, greift nun die Carbonylgruppe der Peptidbindung an. Dabei entsteht ein tetraedrischer Übergangszustand.

3. Schritt: Im dritten Schritt fällt dieser Übergangszustand in sich zusammen, das protonierte Glu131/Glu151 agiert dabei als Säure, indem es das Proton auf die Aminkomponente des Substrats überträgt und diese abdiffundiert.

4. Schritt: Durch Anlagerung eines neuen Substratpeptids und eines Wassermoleküls wird die Carbonsäure freigegeben. Somit kann der Katalysezyklus kann erneut beginnen.

1.8.2 Clan MA

Über die Hälfte der Metalloproteasen gehören zu dem Clan MA. Dieser beinhaltet Zink-abhängige Metalloproteasen mit dem Zink-Binde-Motiv **His**-Glu-Xaa-Xaa-**His** ('HEXXH'), Glutaminsäure (Glu) fungiert dabei als katalytischer Rest. Dieses Sequenzmotiv kommt neben Proteasen auch in vielen anderen Proteinen vor und wird deshalb noch weiter differenziert in: Xaa-Xbb-Xcc-**His**-Glu-Xbb-Xbb-**His**-Xbb-Xdd. Xaa ist entweder eine hydrophobe Aminosäure oder Threonin, Xbb ist ein ungeladener Rest, Xcc kann jede Aminosäure außer Prolin sein und bei Xdd handelt sich um eine hydrophobe Aminosäure. Dieses Binde-Motiv besitzt eine definierte Struktur (Jongeneel *et al.*, 1989). Dabei befindet sich das HEXXH-Motiv in einer α -Helix, der dritte Zinkligand befindet sich innerhalb einer weiteren α -Helix, beide Helices sind über ein β -Faltblatt miteinander verbunden. Bei den meisten Familien in diesem Clan besteht die Protease aus zwei Domänen, wobei sich das aktive Zentrum zwischen diesen Domänen befindet. Die N-terminale Domäne beinhaltet die zwei α -Helices inklusive des HEXXH-Motivs und das sechssträngige β -Faltblatt, dieser Bereich ist konserviert. Die C-terminale Domäne kann jedoch, abhängig von der jeweiligen Protease, von sehr komplexen Strukturen bis zu einer kleinen α -Helix reichen. Deshalb wird nur der N-Terminus als Basis zur Klassifizierung herangezogen.

Der Clans MA kann anhand des dritten Zinkligands weiter in die zwei Subclans MA(E) und MA(M)differenziert werden. Die Proteasen des Subclans MA(E) werden auch 'Gluzincins' (Hooper, 1994) genannt. Bei dem dritten Liganden handelt es sich um Glutamat, dieser ist 18-72 Reste in C-terminaler Richtung vom HEXXH-Motiv entfernt. In diesem Subclan kommen sowohl Endo- als auch Exopeptidasen vor, ein klassischer Vertreter ist Thermolysin (Abb. 1-9).



Abb. 1-9: Struktur von Thermolysin (Inouye *et al.*, 1998, modifiziert)

Die Kristallstruktur von Thermolysin (Abb. 1-9) aus der Familie M4 ist ein Musterbeispiel für den Subclan MA(E). Sie zeigt eine Zwei-Domänen-Struktur, das aktive Zentrum ist dabei in dem Spalt zwischen den beiden Domänen lokalisiert. Die N-terminale Domäne hat ein zentrales sechsstrangiges β -Faltblatt, bei dem der zweite und der sechste Strang antiparallel zu den anderen orientiert sind. Außerdem befinden sich im N-terminalen Bereich zwei Helices, die im 90° -Winkel zueinander stehen. Eine dieser Helices beinhaltet das HEXXH Zink-Binde-Motiv. Die C-terminale Domäne besteht nur aus Helices, wobei eine von ihnen den dritten Zinkliganden koordiniert. Die Ligand-tragenden Helices sind über eine kurze Spirale miteinander verbunden.

Andere Familien dieses Subclans zeigen ähnliche, aber oft komplexere N-terminale Domänen, es gibt jedoch keinerlei Ähnlichkeiten zwischen den C-terminalen Enden der verschiedenen Familien.

Der Subclan MA(M) ist auch unter dem Namen `Metzincins` bekannt, im Gegensatz zu den `Gluzincins` besitzen die Mitglieder dieser Gruppe ein längeres Zink-Binde-Motiv (His-Glu-Xaa-Xaa-His-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-His/Asp), in dem der dritte Ligand entweder Histidin oder Aspartat ist. Das Glycin befindet sich in der β -Schleife, welche die beiden α -Helices zusammenbringt, es ist konserviert und essentiell (Bode *et al.*, 1992). Die Familien dieses Clans besitzen eine zusätzliche β -Schleife die ein konserviertes Methionin enthält. Die Unterscheidung dieser Familien erfolgt anhand der Reste, die dieses Methionin umgeben, und den Aminosäuren, die nach dem dritten Liganden folgen

(Hooper, 1994; Stöcker *et al.*, 1995). Bei den Mitgliedern dieses Subclans z.B. Collagenase 1, handelt es sich ausschließlich um Endoproteasen.

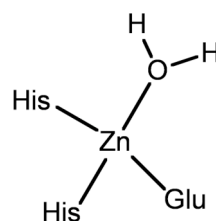
1.8.3 Clan MM

Der Clan MM ist der zweite Clan mit einem HEXXH Zink-Binde-Motiv, alle Proteasen dieser Gruppe gehören zur Familie M50. Der dritte Zinkligand ist Aspartat welches 300 Reste in C-terminaler Richtung vom HEXXH-Motiv entfernt liegt. Typisch für diesen Clan sind membrangebundene Proteasen bei denen sich das aktive Zentrum innerhalb der Membran befindet. Proteasen dieses Clans regulieren z.B. die Genexpression indem sie Transkriptionsregulatoren proteolytisch spalten. Bisher konnte noch keine Tertiärstruktur für eines dieser Mitglieder gelöst werden. Strukturähnlichkeiten zum Clan MA sind jedoch unwahrscheinlich, da sich die Zinkliganden innerhalb der Membran befinden und β -Faltblätter, die ein wichtiges Merkmal des Clan MA sind, nicht vorkommen.

Ein Vertreter dieser Klasse ist z.B. die S2P Protease, welche sich in der Membran des endoplasmatischen Retikulums befindet und den N-Terminus der Transkriptionsfaktor-Domäne des Sterol-Regulatorische-Element-Binde-Proteins (SREBP) freisetzt. Daraufhin kann dieses dann Gene aktivieren, die an der Cholesterolaufnahme und –synthese beteiligt sind.

1.8.4 Familie M48

Unter den Metalloproteasen gibt es Familien, die keinem Clan richtig zugeordnet werden können, die Familie M48 stellt eine solche Untergruppe dar. Zur Familie M48 gehören überwiegend Transmembranpeptidasen, die ein konserviertes HEXXH Zink-Binde-Motiv besitzen, ähnlich dem von Clan MA und MM. Im Gegensatz zu Clan MM befinden sich die Zinkliganden aber nicht in der Transmembrandomäne, sondern sind extrazellulär nahe der Membranoberfläche angeordnet. Die extrazelluläre Domäne ist jedoch kleiner als die aus dem Clan MA. Die Proteasen dieses Clans besitzen ein katalytisches Zink-Ion, welches tetraedrisch an zwei Histidinresten, einem Glutamat und Wasser koordiniert ist.



Ein klassischer Vertreter dieser Familie ist die Ste24 Endopeptidase aus *Saccharomyces cerevisiae*, eine membrangebundene Protease, welche C-terminal den Vorläufer des 'A-factor mating pheromone' prozessiert. Ste24 befindet sich in der Membran des endoplasmatischen Retikulums, mit dem N-Terminus im Lumen und dem C-Terminus und dem aktiven Zentrum im Cytoplasma. Das HEXXH-Motiv ist extrazellulär aber nah an der Membranoberfläche lokalisiert. Eine Mutation im ersten Histidin und Glutamat führt dazu, das Ste24 inaktiv ist (Fujimura-Kamada, 1997). Dies belegt, dass diese Reste essentiell für die Katalyse sind. Die Ste24 Endopeptidase besitzt eine Vielzahl an Homologen, in *E. coli* ist dies z.B. das Hitzeschockprotein HtpX und in Eukaryonten die Protease Oma1.

1.9 Oma1

Oma1 zählt als membrangebundene Metalloprotease zur Familie M48 und stellt das humane Homolog zu HtpX, YggG und YfgC dar (Abb. 1-10). Oma1 ist durch zwei Transmembranhelices in der Innenmembran von Mitochondrien integriert und wird somit als 'Multi-pass' Membranprotein bezeichnet. Das 60 kDa große Protein wird besonders stark in Herz, Nieren, Leber und der Skelettmuskulatur exprimiert (Bao, 2003). Die proteolytische Seite der Protease befindet sich auf der Matrixseite der Innenmembran und ist, so wie sein prokaryotisches Homolog HtpX, an der Proteolyse von fehlgefalteten Membranproteinen beteiligt. Oma1 besitzt dabei überlappende Funktionen mit der ATP-abhängigen m-AAA-Protease, einer Metalloprotease die Homologien zum prokaryotischen FtsH aufweist (Käser *et al.*, 2003). Das Substrat von Oma1 und der m-AAA-Protease ist Oxa1, ein Membranprotein, das über fünf Transmembranhelices in der Innenmembran von Mitochondrien integriert ist. Oxa1 ist an der Integration von anderen Innenmembranproteinen beteiligt (Bonney *et al.*, 1994). Die m-AAA-Protease erkennt den C-terminus von fehlgefaltetem Oxa1 und prozessiert es. Wenn die m-AAA-Protease fehlt, wird Oxa1 ATP-unabhängig durch Oma1 und eine bisher unbekannten Protease abgebaut. Oma1 setzt im Vergleich zu den m-AAA-Proteasen das Substrat nicht vollständig um (Langer *et al.*, 2001), dies resultiert in der Akkumulation der proteolysierten Fragmente.

Oma1 übernimmt also eine wichtige Funktion in der Proteinqualitätskontrolle der Mitochondrien und ist relevant für die Erhaltung deren Membranintegrität.

Die Ergebnisse eines `Blast` von *oma1* in der MEROPS-Datenbank ergaben unter anderen Sequenzhomologien zu *htpX*, einem prokaryotischen Homolog mit ähnlichen Funktionen, sowie zu *yfgC*, *ycaL* und *yggG* (Abb. 1-10). Bei den letzteren handelt es sich um größtenteils uncharakterisierte Genprodukte.

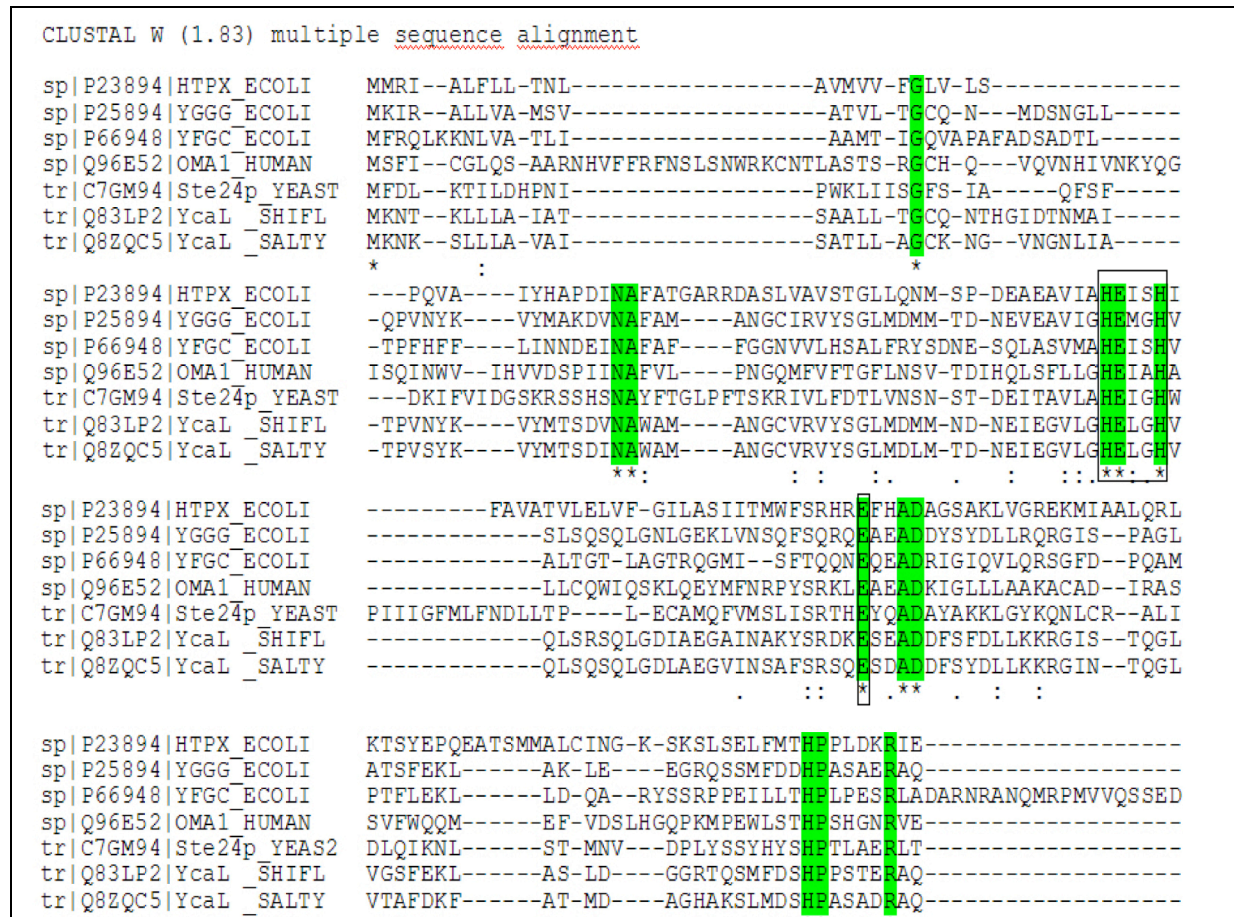


Abb. 1-10: Alignment des HEXXH-Motiv (Clustal W). Eingerahmt ist das konservierte HEXXH-Binde-Motiv und der dritte Zinkligand Glutamat

1.10 HtpX

Die Metalloprotease HtpX ist ein integrales Membranprotein, das mit vier Transmembransegmenten die Innenmembran durchspannt. Das aktive Zentrum des 32 kDa großen Proteins befindet sich auf der cytoplasmatischen Seite der Membran. Nach Aufschluss der Zelle und Solubilisierung aus der Membran, unterliegt HtpX einem Selbstabbau der nur durch Zugabe von Zink-Chelatoren vermieden werden kann. Als Zink-abhängige Endopeptidase wird HtpX der Familie M48 zugeordnet und ist vermutlich Teil der membranlokalisierten Proteinqualitätskontrolle in *E. coli*.

Der Promotor von *htpX* steht unter σ^{32} - und Cpx-Kontrolle, was ein weiterer Hinweis für die Relevanz von HtpX in Bezug auf Zellstress ist. σ^{32} , auch RpoH genannt, ist ein Hitzeschock-Transkriptionsfaktor (Yura, 1984; Arsène, 2000; Foster, 2007) d.h. die Expression von *htpX* wird durch einen Temperaturanstieg induziert (Kornitzer *et al.*, 1991). Der Cpx-Weg ist ein Zwei-Komponenten-System, bestehend aus dem Regulator CpxR und der Histidinkinase CpxA. Es reagiert auf Stress in der Zellhülle, der durch fehlgefaltete Proteine hervorgerufen wird (Danese, 1997; Zahrl, 2006). Ein Stamm mit einer *htpX*-Nullmutation besitzt keinen relevanten Phänotyp, jedoch zeigt sich ein Anstieg in der Transkription einer *cpx-lacZ*-Fusion. Shimohata *et al.* (2002) konnten anhand einer *htpX-lacZ*-Fusion zeigen, dass im Stamm mit einer *cpx*-Nullmutation die Transkription von *htpX* abnimmt. Dagegen stieg die *htpX-lacZ*-Transkription nach einem Temperaturanstieg von 30°C auf 42°C um das fünffache an, wodurch vorherige Daten von Kornitzer *et al.* belegt wurden.

In Verbindung mit FtsH, einer ATP-abhängigen und ebenfalls membrangebundenen Zink-Metalloprotease, ist HtpX mutmaßlich an der Proteolyse von ungefalteten Innenmembranproteinen beteiligt. Zu den Substraten von HtpX gehören neben β -Casein auch das Membranprotein SecY (siehe 1.3), das sowohl *in vitro* und, bei erhöhter Expression beider Proteine, auch *in vivo* degradiert wird (Sakoh *et al.*, 2005). Die *in vitro* Experimente zeigen einen Abbau von cytoplasmatischen und periplasmatischen SecY-Regionen, wohingegen bei den *in vivo* Versuchen nur eine Proteolyse von cytoplasmatischen SecY-Regionen nachgewiesen werden konnte. Demnach ist HtpX eine Komponente der Membranprotein-Degradationsmaschinerie, die von der cytoplasmatischen Seite aus agiert.

Die Korrelation zwischen den Funktionen von HtpX und FtsH zeigt sich im *ftsH* Deletionsstamm, in dem die Transkription von *htpX* drastisch erhöht ist. Zudem weist der *ftsH htpX* Knockoutstamm ein temperatursensitives Wachstum auf, welches durch Transformation mit einem *htpX*-Plasmid komplementiert wird und den Zellen wieder ein Wachstum bei 42°C ermöglicht. Obwohl die physiologischen Rollen von FtsH und HtpX ähnlich sind, unterscheiden sie sich jedoch in ihren Mechanismen. FtsH benötigt zur Proteindegradation einen N- oder C-terminalen Überhang bestimmter Länge (Chiba *et al.*, 2000), HtpX hingegen spaltet seine Substrate innerhalb eines cytoplasmatischen 'Loops' und liefert so möglicherweise einen Angriffspunkt für FtsH.

Die HtpX-Homologe (Abb. 1-10) *yfgC* und *yggG* verursachen als Deletionen in Kombination mit *ftsH* oder *htpX* keine Wachstumsdefekte (Y. Akiyama unveröffentlicht). Somit ist die Rolle von HtpX-Homologen weitestgehend unklar und bedarf weiterer Erforschung.

1.11 YfgC

Die potentielle Protease YfgC wird aufgrund der Sequenzinformationen der Familie M48 zugeordnet, als Homolog von HtpX und YggG besitzt es ein HEXXH Motiv (Abb. 1-10) und beinhaltet demnach ein Zink im aktiven Zentrum. YfgC hat ein Signalpeptid von 27 Aminosäuren Länge und ist unprozessiert 53,9 kDa groß. Der aktive Rest ist Glutamat 136 (Uniprot Datenbank). YfgC besitzt vier TPR-Domänen (Tetratricopeptidrepeat) (Abb. 1-11 und Abb. 1-12).

4 TPR-Domänen: 309-342, 344-376, 377-409, 427-460

MFRQLKKNLVATLIAAMTIGQVAPAFADSADTLPDMGTSAGSTLSIGQEMQMGDYYVRQLRGSA
PLINDPLLTQYINSLGMRLVSHANSVKTPFHFFLINNDEINAFAGGNVVLHSAFRYSDNESQLAS
VMAHEISHVTQRHLARAMEDQQRSAPLTWVGALGSILLAMASPQAGMAALTGTLAGTRQGMISFT
QQNEQEADRIGIQVLQRSGFDPQAMPTFLEKLLDQARYSSRPPEILLTHPLPESRLADARNRANQ
MRPMVVQSSSEDFYLAKARTLGMYNNGRNQLTSDLLDEWAKGNVRQQ**RAAQYGRALQAMEANK**
YDEARKTLQPLLAEPGN**AWYLDLATDIDLGQNKANEAINRLKNARDLRTNPVLQLNLANAYLQGG**
QPQEAANILNRYTFNNKDDSNGWDLAQAEEALNNR**DQELAARAEGYALAGRDLQAISSLSSASS**
QVKLGSLQQARYDARIDQLRQLQERFKPYTKM

Abb. 1-11: Aminosäuresequenz von YfgC mit Signalsequenz (fett) und den 4 TPR-Domänen (uniprot Datenbank)

TPR-Domänen sind an Protein-Protein Interaktionen in einer Vielzahl biologischer Prozesse, wie z.B. der Regulierung von Zellzyklen, der Transkriptionskontrolle oder der Proteinfaltung, beteiligt. Die Domänen sind 34 Aminosäuren lang und bestehen aus sich wiederholenden `helix-turn-helix` Motiven (Wilson *et al.*, 2004; Cortajarena und Regan, 2006), die in diversen Proteinen in allen Organismen zu finden sind. In *E. coli* gibt es neben YfgC noch weitere Proteine mit TPR-Domänen wie z.B. das Lipoprotein Nlpl oder das hypothetische Hitzeschock-Protein YciM (Expasy Datenbank). Die TPR-Domänen verändern durch eine Ligandbindung ihre Konformation nur geringfügig oder gar nicht. Der Promotor von *yfgC* wird durch den SigmaE-Weg reguliert (EcoCyc Datenbank). Die Expression wird also unter erhöhtem Faltungsstress induziert, womit YfgC vermutlich an der Proteinqualitätskontrolle im Periplasma beteiligt ist.

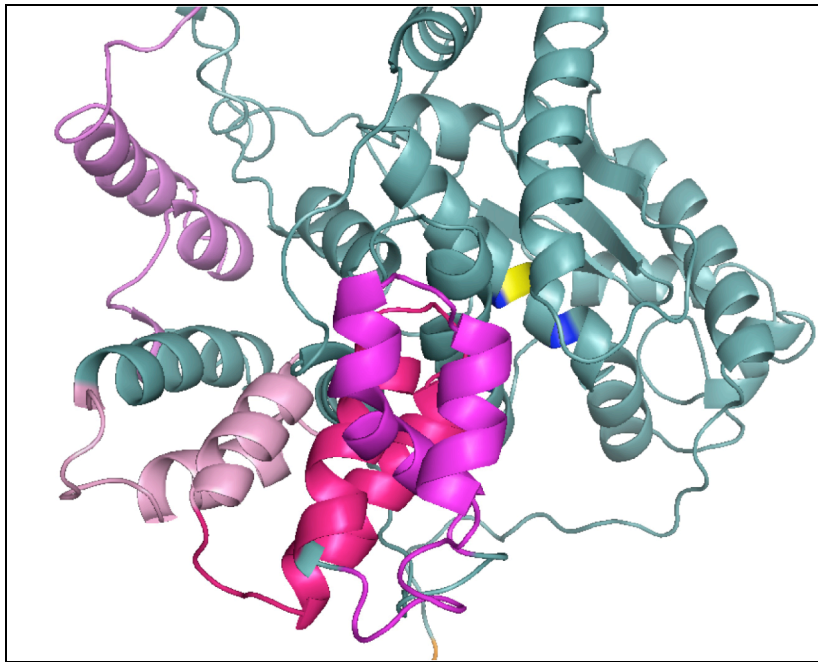


Abb. 1-12: Modell von YfgC in PyMol dargestellt. Zu sehen sind die 4 TPR-Domänen in flüchtig, rosa, pink und violett, sowie das aktive Zentrum in gelb

1.12 YggG

YggG gehört als Homolog von YfgC, HtpX und Oma1 ebenfalls zur Familie M48. Die hypothetische Protease ist unprozessiert 26,8 kDa groß und hat ein Signalpeptid von 18 Aminosäuren (Abb. 1-13 orange). Der *yggG* Stamm besitzt keinen Wachstumsdefekt und zeigt keinen anderen relevanten Phänotyp (Akiyama, unveröffentlicht, zitiert in Sakoh, 2005; Weski, unveröffentlicht). YggG ist ein potentielles Lipoprotein (Juncker, 2003), welches anhand der zweiten Aminosäure nach dem N-terminalen Cystein (1.5 Sekretion von Lipoproteinen: Lol-System) MKIRALLVAMSVATVLTGCQ**N** theoretisch in der Außenmembran verankert ist. Das aktive Zentrum von YggG beinhaltet, laut bioinformatischen Vorhersagen (URL:www.uniprot.de), ein katalytisch wirksames Zink-Kation, welches durch die Aminosäuren Histidin 130, Histidin 134 und Glutamat 189 koordiniert ist (Abb. 1-13 blau). Der aktive Rest wird durch Glutamat 131 (Abb. 1-13 rot) gebildet.

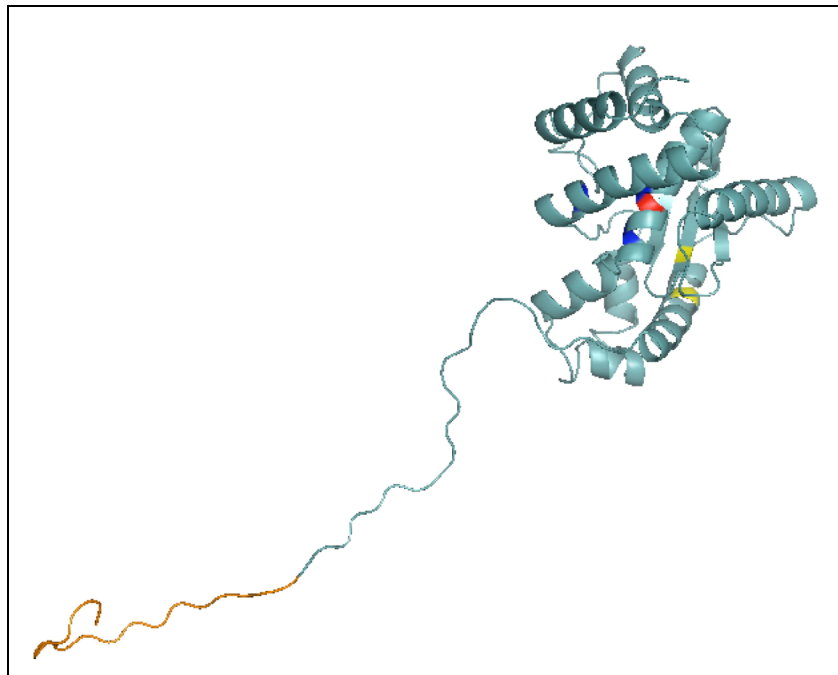


Abb. 1-13: Modell von YggG in PyMol dargestellt. Zu sehen sind die Signalsequenz in orange, das aktive Zentrum in rot, die Zinkliganden in blau und Cysteine in gelb

YggG wird durch den Rcs-Signalweg reguliert. Das Rcs-System wird durch Stressfaktoren in der Peptidoglykanschicht, wie z.B. Schäden durch Antibiotika, induziert (Ferrières, 2003; Laubacher, 2008). Zusätzlich steht der Promotor von *yggG* unter Sigma70-Kontrolle (RegulonDB), ein Sigmafaktor der für die generelle Genexpression während der exponentiellen Phase essentiell ist.

Laut Ojima *et al.* (2009) übt die verstärkte Expression von *yggG* einen positiven Einfluss auf die Synthese von L-Phenylalanin aus. Grund dafür ist vermutlich die Reduktion der Essigsäurebildung in diesem Stamm, welche auf die verminderte Expression von *pta*, *ackA*, *poxB* zurückzuführen ist. Die Produkte der genannten Gene sind in die Essigsäuresynthese involviert. Bei *Pta* handelt es sich um eine Phosphat-Acetyltransferase, *AckA* ist eine Acetatkinase und *PoxB* eine Pyruvatoxidase. Die Funktion, die YggG in diesem Zusammenhang übernehmen könnte, ist jedoch noch unklar und bedarf weiterer Erforschung.

2. Zielsetzung

Die Zellhülle von *E. coli* beinhaltet viele Proteine und Chaperone, die am Aufbau der Zellhülle, an der Proteinqualitätskontrolle, sowie an der Erhaltung der Membranintegrität beteiligt sind. So ist z.B. DegP ein periplasmatisches Protein, welches besonders unter Stressbedingungen, wie z.B. erhöhter Temperatur oder Osmolarität, sowie unter Antibiotikazusatz und pH-Wertveränderungen wichtig ist. Dabei ist es im Periplasma von *E. coli* sowohl in den Abbau von fehlgefalteten Proteinen, als auch an der Assemblierung von Außenmembranproteinen involviert. Andere Proteine, wie z.B. SurA, eine Prolinisoimerase mit zusätzlicher Chaperonaktivität, sind ebenfalls relevante Faktoren im Aufbau der Außenmembran. Die erwähnten Proteine machen jedoch nur einen kleinen Teil der Faktoren aus, die in der Proteinqualitätskontrolle der Zellhülle involviert sind. Viele Proteine, die in diesem Zellkompartiment agieren, sind bisher noch uncharakterisiert. So sind z.B. die Faltungsfaktoren, die in der Assemblierung von BamA und TolC involviert sind, bisher noch nicht charakterisiert (Vertommen *et al.*, 2009). Die uncharakterisierten Metalloproteasen YfgC und YggG, sind laut bioinformatischen Vorhersagen auch in der Zellhülle von *E. coli* lokalisiert und vermutlich in stressinduzierte Prozesse involviert. Ziel dieser Arbeit ist daher die Charakterisierung von YfgC und YggG, um deren Funktion und physiologische Bedeutung innerhalb von *E. coli* einzuordnen. Die *in vivo* Charakterisierung der putativen Metalloproteasen soll durch die Untersuchung von Deletionsstämmen und transkriptionellen Promotor-*lacZ*-Fusionen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen erfolgen. Des Weiteren können Genomearrays Aufschluss über die Genregulationen in Deletions- und überexprimierenden Stämmen liefern. Zur Ermittlung potentieller Substrate und Interaktionspartner sollen zwei Methoden eingesetzt werden: zum Einen die Co-Immunpräzipitation und zum Anderen die massenspektrometrische Analyse der Membranpräparationen von Wildtyp- und Deletionsstämmen. Die Verifizierung soll soweit möglich durch Westernblot Analysen erfolgen. Die Ermittlung nativer Substrate kann dabei helfen, die potentiellen Metalloproteasen essentiellen Prozessen des Bakteriums zuzuordnen. Zusätzlich soll mittels Westernblot Analyse unterschiedlicher Zellkompartimente die tatsächliche Lokalisation der Proteine aufgeklärt werden. Für *in vitro* Analysen werden *yfgC* und *yggG* in Expressionsvektoren kloniert und anschließend die Reinigungen der Proteine etabliert. Das gereinigte YfgC bzw. YggG soll in Proteolyseansätzen mit unterschiedlichen bekannten Protease-Substraten getestet werden. So können potentielle Substrate für weitere *in vitro* Untersuchungen wie z.B. Schnittstellenanalysen ermittelt werden. Außerdem sollen bei der *in vitro* Charakterisierung die Oligomerisierungszustände mittels Gelfiltration und chemischen `Crosslinking` analysiert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

Folgende *E. coli*-Stämme wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Tab. 3-1 Bakterienstämme

Stamm	relevanter Genotyp	Herkunft
BRE1161	MC4100 <i>F</i> ⁻ , <i>araD139</i> , <i>deoC1</i> , <i>flbB5301</i> , <i>ptsF25</i> , <i>rbsR</i> , <i>relA1</i> , <i>rpsL150</i> , $\Delta(\textit{argF-lac})$ U169, $\emptyset P[(\textit{malT-lacZ})]$, $(\textit{lambda} \textit{d} \textit{lacMu50})]$	Bremer, 1985
BRE1162	MC4100 <i>malK-lacZ</i>	Bremer, 1985
BW23474	$\Delta(\textit{argF-lac})169$, $\Delta \textit{uidA4}::\textit{pir-116}$, <i>recA1</i> <i>rpoS396</i> (Am), <i>endA9</i> (del-ins)::FRT, <i>rph-1</i> <i>hsdR514</i> , <i>rob-1</i> , <i>creC510</i>	Wanner B.L.
BW30270	<i>F</i> ⁻ , <i>lambda</i> ⁻ , <i>ilvG</i> ⁻ , <i>rfb-50</i> , <i>rph</i> ⁺ , <i>fnr</i>	CGSC – The Coli Genetic Stock Center, Yale University
CL1	KS272 λ Promotor <i>ydgD-lacZ</i>	Diese Arbeit
CL2	KS272 λ Promotor <i>yfgC-lacZ</i>	Diese Arbeit
CL3	KS272 λ Promotor <i>ycaL-lacZ</i>	Diese Arbeit
CL4	KS272 λ Promotor <i>yggG-lacZ</i>	Diese Arbeit
DH5 α	<i>F</i> ⁻ , <i>supE44</i> , <i>lacU169</i> , [$\Phi 80 \textit{lacZ M15}$], <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , (<i>res</i> ⁻ , <i>mod</i> ⁺), <i>deoR</i>	Hanahan, 1983
KS272	MC1000 <i>F</i> ⁻ , <i>araD139</i> , $\Delta(\textit{ara-leu})7697$, $\Delta \textit{lacYZI74}$ <i>galE</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i>	Strauch K.
KU98	DHB4 <i>degP::kan</i> <i>treA::spec</i>	Laborsammlung
JB2	BW30270 <i>surA::cm</i>	Braun J., 2006
JB3	BW30270 <i>ppiD::tet</i>	Braun J., 2006
JB9	BW30270 <i>degP::tet</i>	Braun J., 2006
JB13	BW30270 <i>ydgD::kan</i>	Braun J., 2006

Stamm	relevanter Genotyp	Herkunft
JB14	BW30270 <i>yfgC::kan</i>	Braun J., 2006
JB15	BW30270 <i>yggG::kan</i>	Braun J., 2006
JB16	BW30270 <i>ycaL::kan</i>	Braun J., 2006
JB32	BW30270 <i>yggG::kan ppiD::tet</i>	Braun J., 2006
JB33	BW30270 <i>ycaL::kan ppiD::tet</i>	Braun J., 2006
JB55	BW30270 <i>yfgC::kan degP::tet</i>	Braun J., 2006
JB56	BW30270 <i>yggG::kan degP::tet</i>	Braun J., 2006
JB65	BW30270 <i>yfgC::kan surA::cm</i>	Braun J., 2006
JB101	BW30270 $\Delta yggG$ <i>yfgC::kan</i>	Braun J., 2006
MC4100	F- araD139 (araF-leu)U169 rpsL 150 deoC1 relA1 ptsF25 flbB5301 rbsR	Casadaban, 1976

3.1.2 Vektoren und Plasmide

Folgende Vektoren und Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt bzw. verwendet.

Tab. 3-2 Vektoren und Plasmide

Vektor/Plasmid	relevanter Genotyp	Resistenz	Herkunft
pAH125	CRIM-Plasmid zur Konstruktion von Promotor- <i>lacZ</i> -Fusionen (<i>lacZ</i> -Kassette)	kan	Wanner et.al 2001
pASK-IBA2	Expressionsvektor, ORF mit ompA-Signalsequenz, C-terminal Strep-tag	amp	IBA, Göttingen
pCS19	pQE60 von Qiagen mit <i>lacIq</i> -Gen	amp	Spiess, 1999
pCL1	pCS19 mit <i>ydgD</i>	amp	Diese Arbeit
pCL2	pCS19 mit <i>yfgC</i>	amp	Diese Arbeit
pCL3	pCS19 mit <i>ycaL</i>	amp	Diese Arbeit
pCL4	pCS19 mit <i>yggG</i>	amp	Diese Arbeit
pCL5	pCS19 mit <i>yggE</i>	amp	Diese Arbeit
pCL6	pAH125 mit <i>ydgDPR-lacZ</i> -Fusion	amp	Diese Arbeit
pCL7	pAH125 mit <i>ycaLPR-lacZ</i> -Fusion	amp	Diese Arbeit

Vektor/Plasmid	relevanter Genotyp	Resistenz	Herkunft
pCL8	pAH125 mit <i>yfgCPR-lacZ</i> -Fusion	amp	Diese Arbeit
pCL9	pAH125 mit <i>yggGPR-lacZ</i> -Fusion	amp	Diese Arbeit
pINT-ts	<i>int</i> (lambda), lambdaPR, Helferplasmid zur Intergration in lambda-attachment-site	amp	Wanner et.al 2001
pYcaL	pASK-IBA2 mit <i>ycaL</i> ohne Signalsequenz mit C-terminalem His-Tag	amp	Diese Arbeit
pYggG	pASK-IBA2 mit <i>yggG</i> ohne Signalsequenz mit C-terminalem His-Tag	amp	Diese Arbeit
pYfgC E137Q	pCS19 mit <i>yfgCE137Q</i>	amp	Diese Arbeit
pYggG E131Q	pCS19 mit <i>yggGE131Q</i>	amp	Diese Arbeit

3.1.3 Oligonukleotide

Alle in Tab. 3-3 aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (München) bezogen.

Tab. 3-3 Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	Verwendung
ydgD for	tattccatggcacgtacaaccattgctgtagtg	Klonierung
ydgD rev	tttttagatctttttgacagttgatccag	
yfgC for	tatatccatggcattcaggcagttgaaaaaa	
yfgC rev	atttagatctcatcttggtataaggcttaaagcg	
ycaL for	attaccatggcaaagaataactaaattactgctggcg	
ycaL rev	taatagatctcttaccagaggcgatacgatcacg	
yggG for	atatccatggcaaaaattcgcgcttattggtagc	
yggG rev	ttatagatctcttaatcccatccgctcatg	
yggE for	tataccatggcaaagttcaaagttatcgccctg	
yggE rev	ataaagatctttgtgctgcaggtgttttagc	

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	Verwendung
ycaL for (EcoRI)	tttgaattccaaaatacccacggtattgatacc	Klonierung
ycaL rev (Sall)	ttttgtcgacttagttagtggtgatggtgatgagatc	
yggG for (EcoRI)	tttgaattccagaatatggactccaacg	
yggG rev (Sall)	ttttgtcgacttagttagtggtgatggtgatgaga	
yfgCE137Q for	cttcagttatggcgacccagatctcccacgtcacccaac	Oligomutagenese
yfgCE137Q rev	gttgggtgacgtgggagatctggtgcgccataactgaag	
yggG E131Q for	gtgatcgccaccagatggggcacgtggcgtaggc	
yggG E131Q rev	gcctaacgccacgtgccccatctggtggccgatcac	
for ydgD promo	ttttctgcagctttagcggagggttagtat	Klonierung Promotor- <i>lacZ</i> - Fusion
rev ydgD promo	ttttgaattcggtaggtaattatgattat	
for yfgC promo	ttttctgcagtgaacctcaagagcgg	
rev yfgC promo	ttttgaattcgtatttctggagatagtcatttg	
for ycaL promo	ttttctgcagagcagctggcgcg	
rev ycaL promo	ttttgaattcgttgattaatcatatataaatattatg	
for yggG promo	ttttctgcagcgaatagcattggcaagctc	
rev yggG promo	ttttgaattcgcacaaggtcaggattattctaa	
pASK-IBA for	gagttattttaccactccct	Verifikation Klonierung
pASK-IBA rev	cgcagtagcggtaaacg	
yfgC Seq	agtccgcaggcggggatggcg	
pAH125 up	ttgtcggtagaacgctctcct	
pAH125 down	aagttgggtaacgccagg	
lambda P1	ggcatcacggcaatatac	
lambda P4	tctggtctggttagcaatg	
attP P2	acttaacggctgacatgg	
attP P3	acgagtatcgagatggca	

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	Verwendung
cheBfor1a	gttgtgatggtttcttcct	qRT-PCR
cheBrev1	gttatacgccagcatacct	
flgAfor1a	agcaataattccgcctg	
flgArev1a	cggcaaccacataatttc	
flgFfor1	ggaaatcactattgctgcc	
flgFrev1	gctttcaccagtttaagacg	
flhCfor1	atcaaagcctaccgtttatacc	
flhCrev1	ccactttcaacaaaccgca	
flhDfor1	cgctatgttcgtctcgg	
flhDrev1	aaacggaagtgacaaacca	
fliAfor1a	cgacaccaataacagcca	
fliArev1a	cagtagttgttagcggg	
fliDfor1	gcgacaaagatccgattacc	
fliDrev1	cgatattcaccgttaccac	
fliFfor1	ttaacccagtccaataccag	
fliFrev1	taccaacaataggcgacag	
fliMfor1	accaatatcaccacctcg	
fliMrev1	accaacaattcccgtagc	
motAfor1	gtcactctgctttctaactcg	
motArev1	ctcttcagttcaataaacgac	

3.1.4 Antikörper

3.1.4.1 Primärantikörper

Tab. 3-4 Primärantikörper

Bezeichnung	Organismus	Herkunft
Penta-His Antikörper	Maus	Qiagen, Hilden
α -YggG	Kaninchen	Diese Arbeit, Laborsammlung
α -YfgC	Kaninchen	Diese Arbeit, Laborsammlung
Alle weiteren Primärantikörper	Kaninchen	Laborsammlung

3.1.4.2 Sekundärantikörper

Tab. 3-5 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Organismus	Herkunft
α -Maus-IgG-AP	Ziege	Sigma-Aldrich, München
α -Kaninchen-IgG-AP	Ziege	Dako, Glostrup, Dänemark

3.1.5 Proteine und Enzyme

3.1.5.1 Verwendete Enzyme

Tab. 3-6 Enzyme

Enzym	Herkunft
DNaseI	Fermentas, St-Leon-Rot
Restriktionsendonucleasen	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
Pfu Ultra High-Fidelity DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, New England Biolabs, Beverly, MA, USA
T4 DNA Ligase	Promega, Madison, WI, USA
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs, Beverly, USA
Trypsin, sequencing grade	Promega, Mannheim

3.1.5.2 Verwendete Proteine

Tab. 3-7 Proteine

Protein	Herkunft
α -Casein	Sigma-Aldrich, München
α -Casein, dephosphoryliert	Sigma-Aldrich, München
β -Casein	Sigma-Aldrich, München
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, München
Casein-Hydrolysat	Sigma-Aldrich, München
DegP	M. Meltzer, AG Ehrmann
FRETS-25Phe	Pepta-Nova, Sandhausen
Gelatine	Sigma-Aldrich, München
Insulin β -Chain ox.	Sigma-Aldrich, München
YcaL	Diese Arbeit
YdgD	Diese Arbeit
YfgC	Diese Arbeit
YfgC E137Q	Diese Arbeit
YggG	Diese Arbeit

3.1.5 Peptide

Die Synthese der Peptide erfolgte in Kooperation mit der AG Kaiser (Patrick Hauske) Chemical-Genomics-Center (CGC) in Dortmund.

Tab. 3-8 Peptide

Peptid
APFPEVFGKEKVNEL
EDIKQMEAESSISSE
ENLLRFFV
EVLNENLLRFFVA
EVLNENLLRFFV
EVLNENLLRFYV
FVAPFPEVFGKEKVN
FGKEKVNELSKDIGG
GTQYTDAPSFSDIPN
GTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW
IVPNSVEQKHIQKEE
KVNELSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEAESIS
PIGSENSEKTTMPLV

Peptid

QAMEDIKQMEAESIG
 SSSEEIVPNSVEQKH
 VLNENLLRFFVAPFP
 VPLGTQYTDAPSFSE

3.1.6 Protein- und Nukleinsäurestandards**Tab. 3-9 Protein- und Nukleinsäurestandards**

Standard	Herkunft
Gelfiltrationskalibrierungskit LMW & HMW	GE Healthcare, München
HiMark™ Prestained HMW Standard	Invitrogen, Karlsruhe
peqGold Protein Marker	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Prestained SDS-PAGE Standard	Bio-Rad, München
Unstained SDS-PAGE Standard	Bio-Rad, München
Quick-Load 2-Log DNA Ladder	New England Biolabs, Beverly, MA, USA

3.1.7 Komplettsysteme**Tab. 3-10 Komplettsysteme**

Komplettsystem	Herkunft
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St-Leon-Rot
Protino Ni-TED 2000	Macherey-Nagel, Düren
Qiaprep Spin Midiprep Kit	Qiagen, Hilden
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QPCR SYBR Green Mix	Thermo Scientific, Waltham MA, USA
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Mannheim
RNeasy® Protect Mini Kit	Qiagen, Hilden

3.1.8 Nährmedien

Abhängig vom Versuch wurden zu untersuchende *E. coli*-Stämme in M9-Minimalmedium oder NZA-Vollmedium kultiviert.

M9- Salze

42 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
 15 g KH_2PO_4
 2,5 g NaCl
 5 g NH_4Cl
 ad 1 l dH_2O

M9-Minimalmedium

200 ml M9 Salze
 2 ml 1 M MgSO_4
 20 ml 20 % Glucose
 100 μl 1M CaCl_2
 ad 1 l dH_2O

SOB-Medium

20 g Bacto Trypton
 5 g Hefeextrakt
 0,5 g NaCl
 0,2 g KCl
 2 g MgCl_2
 2,5 g MgSO_4
 ad 1 l dH_2O

SOC-Medium

SOB-Medium
 + 20 mM Glucose nach dem Autoklavieren

NZA-Medium

10 g NZ-Amine
 5 g Hefeextrakt
 10 g NaCl
 ad 1 l dH_2O

NZA-Platten

NZA-Medium
 15 g Bacto-Agar
 ad 1 l dH_2O

Das Medium wurde je nach Bedarf mit Antibiotika (3.1.9) und/oder IPTG bzw. AHT (3.1.10) versetzt.

3.1.9 Antibiotika

Tab. 3-11 Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$ Medium]
Ampicillin	200
Chloramphenicol	30
Kanamycin	100
Tetrazyklin	10

3.1.10 Weitere Medienzusätze

IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid) wurde als 1 M Stammlösung in A. dest. gelöst und steril filtriert. Je nach Versuchsbedingung wurden Expressionsstämme mit einer Endkonzentration von 10 μ M bis 1 mM IPTG induziert. AHT (Anhydrotetracyklin) wurde als Stammlösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml in DMF gelöst und steril filtriert. Je nach Versuchsbedingung wurden Expressionsstämme mit einer Endkonzentration von 20 ng/ml bis 100 ng/ml AHT induziert.

3.1.11 Chemikalien

Die für Puffer und Lösungen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen und besaßen, soweit nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad „pro analysis“.

3.1.12 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Deoxynucleotide Solution Mix	New England Biolabs, Beverly, USA
Dialysemembranen Zellu TransT1	Roth, Karlsruhe
Dynabeads Protein G	Invitrogen, Karlsruhe
Elektroporationsküvetten, 2mm	PeqLab, Erlangen
Ni-NTA Superflow	Qiagen, Hilden
NuPAGE Novex Midi 10 % Bis-Tris-Gele	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Novex Midi 3-8 % Tris Acetat, Gradienten Gele	Invitrogen, Karlsruhe
Membranfilter 0,45 μ m Supor Membrane	PALL, East Hills, NY, USA
Membranfilter VS 0,25 μ m	Millipore, Neu Isenburg
Objektträger	Menzel, Braunschweig
PVDF Membran	Amersham Hybond P GE Healthcare, München
SFCA bottle top filters 500 ml, 0,2 μ M	Nalgene Labware, Thermo Fisher Scientific, NY, USA

Vivaspin 15R, 5-100 kDa

Vivascience, Stonehouse, UK

Zellulosemembran, Whatman, 19 x 29 cm

GE Healthcare, München

3.1.13 Geräte

Absaugpumpe Typ N811KN.18 KNF

Neuberger, Freiburg

Autoklav

BeliMed, Mühlheim am Inn

DNA-Gelelektrophoresekommer

peqlab, Erlangen

Elektrophoreseapparatur

Bio-Rad, München

Elektroporation Micropulser

BioRad, München

FPLC-Äkta

GE Healthcare, München

Horizontalschüttler

Grant Böckler, Cambridge, GB

Inkubationsschüttler

Innova 44

Magnetenrührer RH basic 2

IKA, Staufen

M-100L Microfluidizer Processor

Microfluidics, Newton, USA

Mikroskop BX61

Olympus, Hamburg

PAGE-Kammer Mini Trans-Blot Cell

BioRad, München

PCR-Gerät Thermocycler Personal

Biometra, Göttingen

Pipetten Eppendorf Research

Eppendorf, Hamburg

pH-Meter

Schott, Mainz

qRT-PCR Gerät Rotor-Gene 3000

Corbett Research, Cambridge, GB

Scanner

UMAX, Astra 4000U

Spannungsgerät Power Pac 200

BioRad, München

Speed-Vac Concentrator 5301-R

Eppendorf, Hamburg

Spektrometer Genios Pro

Tecan, Crailsheim

Spektralphotometer Smart Spec Plus

Bio-Rad, München

Thermomixer comfort

Eppendorf, Hamburg

UV-Transilluminator Gel Imager

Intas, Göttingen

Überkopfschüttler rotator SB3

Stuart

Waagen

Kern, Balingen-Frommern

Western-Blot Apparaturen, Tankblot

Bio-Rad, München

Western-Blot Apparatur Trans-Blot SD

Bio-Rad, München

Zentrifugen:

Biofuge fresco

Heraeus, Hanau

Standzentrifuge Avanti J-E

Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Tischzentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
ESI-MS LCQ Advantage Max betrieben mit Agilent HPLC der Serie 1200	Firma Thermo Finnigan

Alle nicht aufgeführten Geräte entsprechen den üblichen Laborstandards.

3.1.14 Software

Amplify 3.0.1	University Wisconsin
Acrobate Reader® 8.0	Adobe System Inc, San Jose
EndNote	Thomson ResearchSoft, Carlsbad, USA
Chemdraw Ultra 12.0	CambridgeSoft, Cambridge, USA
Office 2008	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Olympus Software	Olympus, Hamburg
Photoshop® 8	Adobe System Inc, San Jose, USA
PerlPrimer	Marshall, 2004
RotorGene	Corbett Research, Qiagen, Hilden
Strider 1.4f9	CEA, Frankreich
UNICORN 5.1	GE Healthcare, München

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

In dieser Arbeit wurden grundlegende molekularbiologische Techniken wie die Herstellung kompetenter Zellen, die Transformation von Bakterien, DNA-Präparation, Restriktion und Ligation, sowie die Auftrennung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese und ihre anschließende Aufreinigung angewendet. Die Durchführung dieser Methoden erfolgte nach den Angaben der jeweiligen Hersteller der entsprechenden Enzyme und Komplettsysteme bzw. nach Maniatis *et al.*, 1989.

3.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis *et al.*, 1987) dient zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten für Klonierungen, sowie für die genotypische Überprüfung von DNA-Konstrukten. Dabei wird die gewünschte DNA-Sequenz durch wiederholte Syntheszyklen mit spezifischen Oligonukleotiden und einer hitzestabilen DNA-Polymerase *in vitro* vervielfältigt. In dieser Arbeit wurden als Polymerasen die Taq-, die Phusion- sowie die PfuUltra-Polymerase (siehe 3.1.5.1) eingesetzt. Die Auswahl der bei der PCR verwendeten Oligonukleotide sowie die Berechnung der Schmelztemperatur erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms „Amplify v 3.0.1“. Als Anlagerungstemperatur wurden von der niedrigeren Schmelztemperatur der beiden Oligonukleotide (*Primer*) drei Grad Celsius abgezogen. Das Protokoll der PCR-Reaktionen wurde je nach verwendeten Oligonukleotiden, DNA-Polymerase und Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments angepasst. Die vorgenommenen PCR-Reaktionen wurden wie folgt durchgeführt:

Ansatz:

Template-DNA	20-200 ng
10 µM <i>Primer</i> forward	2 µl
10 µM <i>Primer</i> reverse	2 µl
10 mM dNTPs	1 µl
5 x Reaktionspuffer	10 µl
5 U/µl Phusion-Polymerase	0,5 µl
DMSO (optional)	1,5 µl
A. dest.	ad 50 µl

Programm:

	30 s	98°C
30x	{ 10 s	98°C
	{ 30 s	3°C unter Schmelztemperatur
	{ 20 s/kb	72°C
	5 min	72°C

Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert und für die weiteren Klonierungsschritte aufgereinigt.

3.2.1.2 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung auf eine korrekte Plasmid-Insertion wurde die PCR direkt von den Bakterien-Kolonien mit Plasmid- bzw. Insertspezifischen Primern durchgeführt (Dallas-Yang *et al.*, 1998). Hierzu wurde eine Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher in 20 µl H₂O überführt, 5 min bei 99°C aufgekocht, kurz auf Eis inkubiert und 10 min zentrifugiert (Tischzentrifuge, 13000 rpm, RT). Anschließend wurden 2 µl des Überstands als *Template* in die PCR-Reaktion eingesetzt.

Ansatz:

<i>Template</i> -DNA	2 µl
10 µM <i>Primer</i> forward	1,25 µl
10 µM <i>Primer</i> reverse	1,25 µl
10 mM dNTPs	0,5 µl
10 x Reaktionspuffer	2,5 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,1 µl
DMSO (optional)	0,75 µl
A. dest.	ad 25 µl

Programm:

	2 min	94°C
30x	15 s	94°C
	30 s	3°C unter Schmelztemperatur
	1 min/kb	72°C
	5 min	72°C

Anschließend wurden die Ansätze auf ein Agarosegel aufgetragen und auf die richtige Fragmentgröße überprüft.

3.2.1.3 Plasmidkonstruktionen

Erläutert wird nur die Konstruktion der Plasmide pCL2 (Abb. 3-1), pCL4 (Abb. 3-2) und pYggG (Abb. 3-3), mit denen in dieser Arbeit die wichtigsten Experimente durchgeführt wurden. Die Tab. 3-2 zeigt eine Übersicht der konstruierten Plasmide.

Die Plasmide pCL2 und pYggG wurden zur Reinigung von YfgC und YggG verwendet. Dabei sollten Proteine über einen C-terminalen His-Tag gereinigt werden. Im ersten Schritt wurden dazu Oligonukleotide generiert, die als Startermoleküle für jeweils eine PCR dienen. In diese Oligonukleotide wurden Schnittstellen (für pCL2 und pCL4: BglII und NcoI; für pYggG: EcoRI und Sall) für die anschließende Klonierung eingefügt (Tab. 3-3). Anschließend wurde eine PCR mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase und dem entsprechenden *Template* durchgeführt (3.2.1.1). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen BglII und NcoI hydrolysiert. Als Zielvektor wurde der Expressionsvektor pCS19 bzw. pASK-IBA2 ausgewählt und auch dieser mit den Restriktionsenzymen BglII und NcoI bzw. EcoRI und Sall geschnitten. Es folgte eine Agarosegelelektrophorese mit anschließender Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel. Der geöffnete Vektor wurde mit dem PCR-Produkt ligiert und der Ligationsansatz anschließend in den Stamm *DH5α* transformiert.

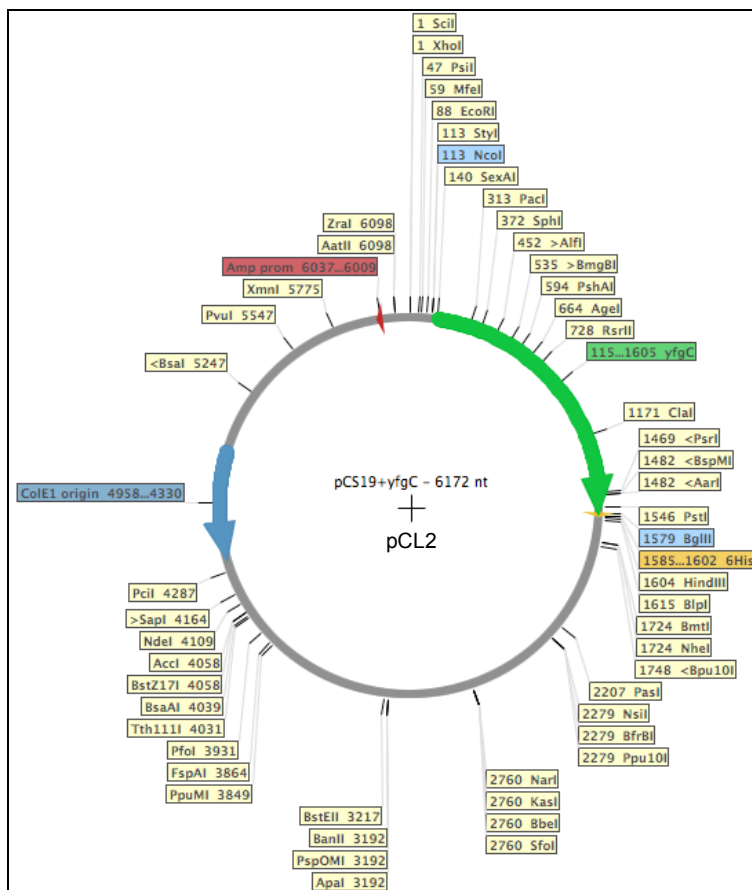


Abb. 3-1: Plasmidkarte *yfgC* in pCS19: pCL2

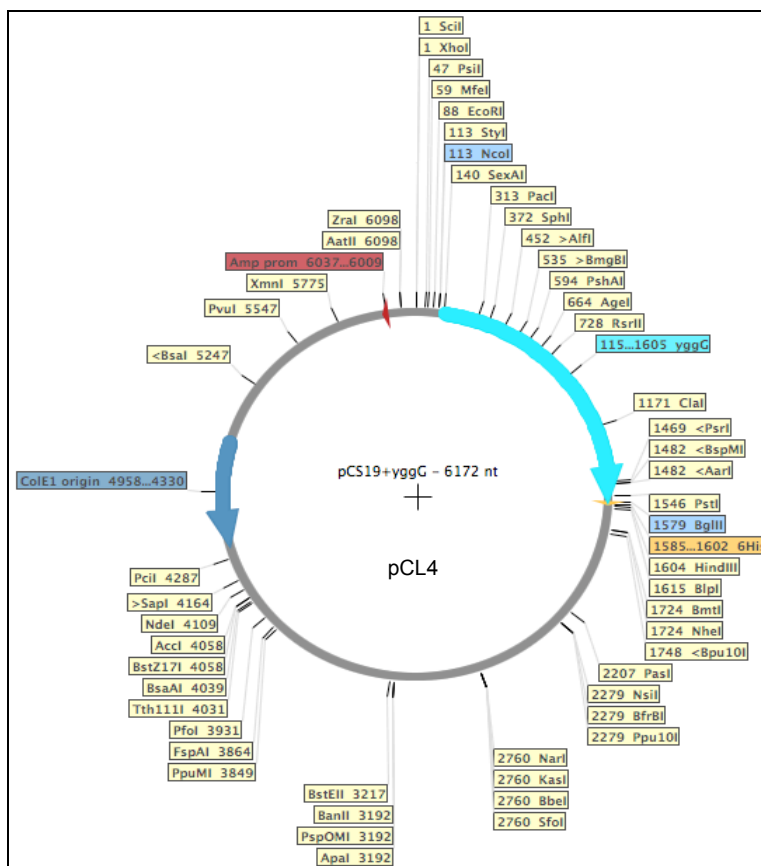


Abb. 3-2: Plasmidkarte *yggG* in pCS19: pCL4

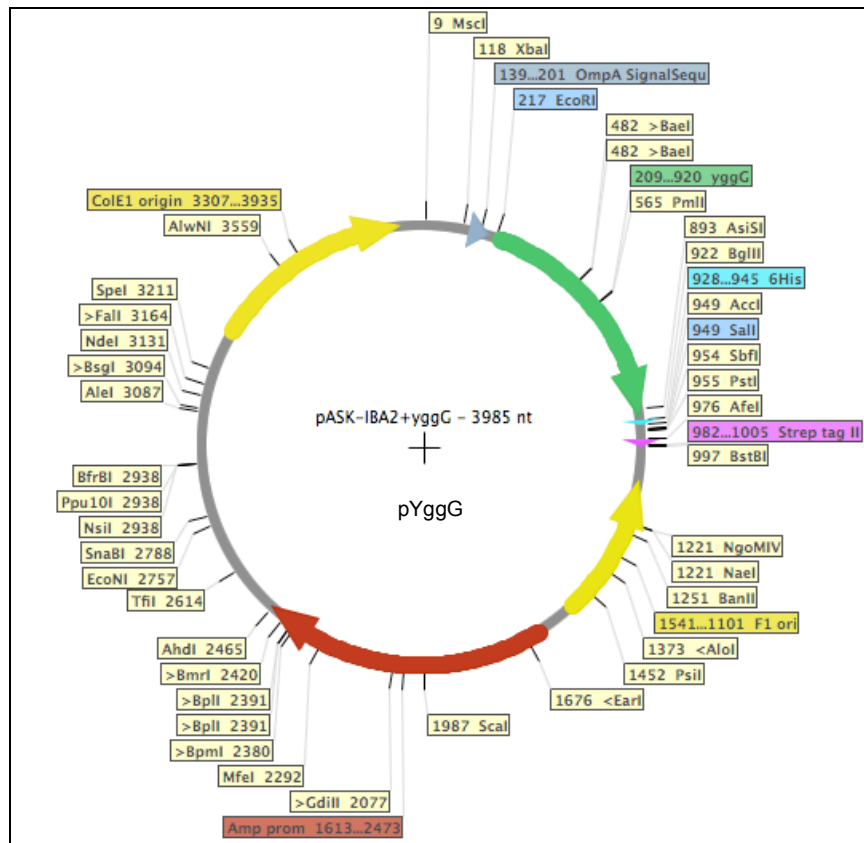


Abb. 3-3: Plasmidkarte *yggG* in pASK-IBA2: pYggG

3.2.1.4 Oligomutagenese

Zum Austausch einzelner Aminosäuren an einer bestimmten Position in einem Protein wurden zwei komplementäre Oligonukleotide generiert, die für die gewünschte Aminosäuresequenz kodieren (Tab. 3-3).

Zur Einführung dieser gezielten Mutation in das Gen wurde der Basenaustausch so gewählt, dass zusätzlich zur gewünschten Mutation eine neue Restriktionsschnittstelle entstand. Auf diese Weise war nach der Oligomutagenese eine Selektion positiver Klone durch Restriktion möglich.

Die PCR wurde mit der Pfu Ultra Polymerase, den generierten Oligonukleotiden und entsprechenden Ausgangsplasmiden (3.1.3 und 3.1.2) durchgeführt.

Ansatz:

Plasmid	5-50 ng
10 μ M <i>Primer</i> forward	2 μ l
10 μ M <i>Primer</i> reverse	2 μ l
10 mM dNTPs	2,5 μ l
10 x Reaktionspuffer	5 μ l
Pfu Ultra Polymerase	1 μ l
A. dest.	ad 50 μ l

Programm:

	2 min	95°C
25x	{	30 s 95°C
		30 s 3°C unter Schmelztemperatur
		1 min/kb 72°C
		10 min 72°C

Nach der PCR-Reaktion wurden dem Ansatz 2 μ l des Restriktionsenzym *DpnI* zugesetzt, um die methylierte Ausgangs-DNA zu verdauen. Der Verdau wurde über Nacht bei 37°C durchgeführt. Anschließend folgte eine Transformation kompetenter Bakterien mittels Hitzeschock.

3.2.1.5 CRIM-Plasmid Integration nach Wanner und Haldimann (2001)

Die CRIM-Plasmid Integration beruht auf einem Einbau des Plasmids in eine spezifische Phagen-*attachment site* des Chromosoms (Wanner und Haldimann, 2001). Dies geschieht mit Hilfe des Enzyms λ -Integrase, welche von Helfer-Plasmiden kodiert wird.

Die Integration von *ydgD*-, *ycaL*-, *yfgC*-, *yggG*-Promotor-*lacZ*-Fusionen in das Chromosom des *E.coli*-Stamms KS272 ($\Delta lacZ$) erfolgte durch die CRIM-Plasmide pAH125 und pINT-ts.

Das Plasmid pAH125 dient zur Konstruktion von Promotor-*lacZ*-Fusionen, wobei der Promotor des gewünschten Gens in die *multiple cloning site* vor das *lacZ*-Gen eingebracht wird.

Zur Konstruktion der Promotor-*lacZ*-Fusionen wurden Oligonukleotide für die jeweiligen Promotoren mit den Schnittstellen EcoRI und PstI generiert (Tab. 3-3). Anschließend wurde eine PCR mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase und der chromosomalen DNA aus MC4100 (siehe 3.1.1) durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte, sowie pAH125, wurden mit den Restriktionsenzymen EcoRI und PstI hydrolysiert. Es folgte eine Agarosegelelektrophorese (Maniatis *et al.*, 1989) mit anschließender Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel (Qiaquick Gel Extraction Kit, Qiagen). Der geöffnete Vektor wurde mit dem PCR-Produkt ligiert und der Ligationsansatz anschließend in elektrokompente BW23474 transformiert. Dieser Stamm synthetisiert das *trans*-acting II Protein (pir), welches zur Replikation der CRIM-Plasmide benötigt wird. Nach Selektion über Kanamycin-Platten wurde aus 5 ml Kulturen eine Plasmidpräparation vorgenommen (Qiaprep Spin Miniprep Kit, Qiagen). Diese Plasmide wurden nach vorausgegangener Kontrollrestriktion zur Sequenzierung (3.2.1.6) geschickt.

Damit die Plasmide in das Chromosom von KS272 (Δ *lacZ*) integriert werden konnten, musste dieser zuvor mit dem Helfer-Plasmid pINT-ts transformiert werden. Dies geschah mittels Elektrotransformation (Sambrook *et al.*, 1989). Da pINT-ts temperatursensitiv ist, wurde der Ansatz nach der Elektroporation 1h bei 28°C inkubiert. Nach Selektion über Ampicillin-Platten wurden elektrokompente Zellen hergestellt (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurden die Kulturen in SOB-Medium + Ampicillin bei 30°C herangezogen.

Die Plasmide mit den unterschiedlichen Promotor-*lacZ*-Fusionen (3.1.2) wurden dann in die elektrokompenten KS272 + pINT-ts eingebracht. Nach der Elektroporation wurden die Bakterien in 1 ml SOC-Medium ohne Antibiotikum resuspendiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit integriert das pAH125 + Promotor-*lacZ*-Fusion in die λ - *attachment site* des Chromosoms mit Hilfe der λ -Integrase, welche vom Helferplasmid pINT-ts stammt. Anschließend wurden die Ansätze für 30 min bei 42°C inkubiert, um das temperatursensitive Helfer-Plasmid zu entfernen. Danach wurden die Bakterien auf Kanamycin-Platten ausplattiert und bei 37°C inkubiert.

Es erfolgte eine weitere Selektion über Ampicillin-Kanamycin-Platten, um den Verlust des Helfer-Plasmids zu kontrollieren. Von den selektionierten Kolonien wurde ein Kolonie-PCR (3.2.1.2) durchgeführt, um die Zellen mit der gewünschten `Einfach-Integration` zu bestimmen. Dafür wurden in der PCR alle vier Oligonukleotide (3.1.3) gleichzeitig eingesetzt.

Dabei können verschiedene Fragmente entstehen:

Tab. 3-12 CRIM-Plasmid Integration

Anlagerung von	Fragmentgröße	Integration
lambda P1+ lambda P4	741 bp	keine
lambda P1+ attP P2	577 bp	einfach
lambda P4+ attP P3	666 bp	
lambda P1+ attP P2	577 bp	mehrfach
attP P2 + attP P3	502 bp	
lambda P4+ attP P3	666 bp	

Die in der PCR als `Einfach-Integration` richtig identifizierten Klone wurden noch zweimal über Kananmycin-Platten gereinigt und zur letzten Kontrolle nochmals auf Ampicillin-Kanamycin-Platten ausgestrichen. Von den so kontrollierten Klonen wurden Flüssigkulturen mit 7% DMSO versetzt, schockgefroren und als Stocks bei -80°C gelagert.

3.2.1.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung von rekombinanten Plasmiden wurde als Auftragsarbeit von der Firma GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt.

3.2.1.7 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde mit dem RNeasy® Protect Mini Kit von Qiagen durchgeführt.

Bakterien einer 5 ml-Übernachtskultur wurden einmal in M9-Minimalmedium gewaschen und anschließend in 5 ml frisches M9-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,2 überimpft. Die Kulturen wurden bei 37°C inkubiert, wobei Kulturen mit Plasmid nach 2 h mit 50 µM IPTG induziert und für weitere 3 h inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen geerntet. Hierfür wurden 5x10⁸ Zellen abzentrifugiert, in 500 µl M9-Medium aufgenommen und sofort mit 1 ml *RNA Protect Bacteria Reagent* von Qiagen durch kurzes Vortexen gemischt, um die RNA zu stabilisieren. Nach einem 5-minütigen Inkubationsschritt wurden die Proben bei 5000 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand schließlich verworfen. Das Pellet wurde für max. eine Woche bei -80°C gelagert. Zur weiteren Isolation wurden die Pellets in 100 µl Lysis-Puffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die Proben mit 350 µl RLT-Puffer von Qiagen und 250 µl 100% Ethanol vermischt und auf die RNeasy® Mini Spin-Säule gegeben. Die nachfolgenden Wasch- und Elutionsschritte wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Lysis-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8

1 mM EDTA

1 mg/ml Lysozym

3.2.1.8 cDNA-Synthese

Vor der cDNA-Synthese wurden 3 µg RNA mit DNaseI von Fermentas nach Angaben des Herstellers verdaut. Aus diesem Ansatz wurden 3 µl entnommen und in die cDNA-Synthese eingesetzt. Die Reaktion wurde mit Hexamer-Oligonukleotiden zufälliger Sequenz (*Random Hexamers* des First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas) nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.1.9 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die Quantifizierung spezifischer RNA bzw. cDNA zur Expressionsanalyse einzelner Gene erfolgte mit Hilfe der qRT-PCR.

Design von qRT-PCR-Primern

Primer für die qRT-PCR (siehe 3.1.3) wurden mit Hilfe des Programms Perl Primer entworfen. Dabei wurden folgende Bedingungen gewählt:

- T_m der *Primer* zwischen 58°C und 60°C
- Maximal 2°C Temperaturdifferenz zwischen den T_m des *sense*- und *antisense-Primer*
- G/C-Gehalt zwischen 40 % und 60 %
- *Primer*-Länge zwischen 18 und 24 nt
- Länge des Amplicons zwischen 90 und 130 bp

Die *Primer*-Paare wurden mit Hilfe des Programms auf die Möglichkeit intra- und intermolekulare Sekundärstrukturen zu bilden, untersucht. Das *Primer*-Paar mit der geringsten Neigung zur Sekundärstrukturbildung wurde durch Datenbanksuche (www.ecogene.org/blast.php) auf Spezifität hinsichtlich des Zielgens untersucht.

Bestimmung der *Primer*-Effizienz

Die Effizienz der entworfenen *Primer* wurde mit Hilfe eines *Pools* aus den hergestellten cDNA-Proben (siehe 3.2.1.6) bestimmt.

Jeweils in Dreifachbestimmung unter Verwendung der zu untersuchenden *Primer* wurden 0,02 ng, 0,2 ng, 2 ng, 20 ng, 50 ng oder 100 ng der cDNA in die Reaktion eingesetzt. Unter Verwendung des Programms RotorGene wurden in einem Diagramm der Logarithmus der Konzentration auf der Abszisse und die C(T)-Werte auf der Ordinate aufgetragen. Die Steigung m der resultierenden Gerade wurde über lineare Regression bestimmt. Aus der Steigung m konnte dann die Amplifikationseffizienz E mit folgender Formel berechnet werden:

$$E = 10^{(-1/m)}$$

Für die qRT-PCR wurden nur solche Primer verwendet, deren Effizienz zwischen 1,8 und 2,1 lag.

qRT-PCR-Ansatz

Jede qRT-PCR-Messung wurde in Dreifachbestimmung mit Hilfe des QPCR SYBR Green Mix von Thermo Scientific nach Herstellerangaben durchgeführt. In jede Reaktion wurden 45 ng cDNA eingesetzt, außerdem wurde für jedes *Primer*paar eine Wasserkontrolle mitgeführt.

Die Ergebnisse der Messung wurden in Microsoft Excel importiert und wie im Folgenden beschrieben ausgewertet.

Auswertung

Für die Berechnung der relativen Expressionlevel wurde die sogenannte Pfaffl-Methode (Pfaffl, 2001) angewandt:

$$\frac{(E_{Ziel})^{\Delta C(T)_{Ziel(Kontrolle-Probe)}}}{(E_{Ref})^{\Delta C(T)_{Ref(Kontrolle-Probe)}}}$$

Dabei sind E_{Ziel} und E_{Ref} die relativen *Primer*-Effizienzen (siehe oben) für das Transkript des Zielgens bzw. des Referenzgens. Die C(T)-Werte der Proben wurden mit Hilfe des Programms RotorGene bestimmt. Dafür wurde die logarithmische Darstellung der Fluoreszenzkurven ausgewählt, die durchschnittliche Hintergrundfluoreszenz der Zyklen zwei bis zehn subtrahiert und der Schwellenwert der Fluoreszenz auf 0,025 gesetzt.

Die Expression des Zielgens wurde außerdem relativ zu mehreren Referenzgenen bestimmt, um Fehler bei der Bestimmung der relativen Expression des Zielgens aufgrund

möglicherweise vorhandener Regulationsmechanismen der *housekeeping genes* zu minimieren. Die gemessenen Referenzgene wurden mit Hilfe des Makros GeNorm für Microsoft Excel anhand eines Genexpressionsnormalisierungsfaktors aus dem geometrischen Mittel der Referenzgene hinsichtlich der Stabilität ihrer Expression bewertet. Die stabilsten Referenzgene (*gapA* und *aceE*) konnten daraufhin ausgewählt und ihr geometrisches Mittel für die Normalisierung verwendet werden (Vandesompele, 2002).

3.2.1.10 *E.coli*-Genome-Array (Affimetrix)

Der *E.coli*-Genome-Array gibt Aufschluss über die Regulation von Genen auf RNA-Ebene. Der Gen-Chip ist mit dem kompletten genetischen Probensatz, in Form von Oligonukleotiden, des *E.coli*-Stamms K12 beschichtet.

Durch die Genome-Arrays wurde der Unterschied zwischen den Stämmen Wildtyp BW30270, JB13 (*ydgD::kan*), JB14 (*yfgC::kan*), JB15 (*yggG::kan*), JB16 (*ycaL::kan*) und deren Komplementären auf RNA-Ebene untersucht. Außerdem sollte analysiert werden, ob die Überexpression der verschiedenen Proteasen einen regulatorischen Einfluss auf andere Gene besitzt, um so die Rolle der Proteasen in *E.coli* und potentielle Substrate zu ermitteln. Die Kultivierung der zu untersuchenden Stämme erfolgte in M9-Medium bei 37°C, wobei Kulturen mit Plasmid nach 2 h mit 50 µM IPTG induziert und für weitere 3 h inkubiert wurden. Anschließend wurde die RNA isoliert (3.2.1.6). Von der RNA ausgehend wurde im Auftragslabor der *E. coli* Genome 2.0 Array nach dem Affymetrix-Protokoll durchgeführt und ausgewertet.

3.2.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.2.1 Sterilisation

Alle verwendeten Medien und Lösungen wurden zur Sterilisation für 20 min bei einem Druck von 2 bar und einer Temperatur von 120°C autoklaviert. Die Sterilisation von hitzelabilen Lösungen erfolgte durch Filtration (0,2 µm Membran). Glasgeräte wurden für 4 h hitzesterilisiert.

3.2.2.2 Anzucht von *E. coli*

E. coli wurde auf Festmedium (NZA-Agarplatten) oder in Flüssigkultur kultiviert. Je nach Versuchsbedingungen betrug die Temperatur zur Anzucht 28°C - 43°C. Flüssigkulturen wurden von Stammpplatten mit Einzelkolonien überimpft. Kulturvolumina bis 5 ml wurden auf einem Brutroller, größere Volumina auf einem Rundschüttler bei 180 rpm inkubiert. Nach einer Anzucht von mindestens 12 h wurden die Kulturen als Übernachtskultur (ÜN-Kultur) bezeichnet.

3.2.2.3 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Die Zellzahl in *E. coli*-Flüssigkulturen wurde durch das Messen der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Bio-Rad-Photometer bestimmt. Nach Miller entspricht eine OD₆₀₀ von 1 etwa einer Zellzahl von 10⁹ Zellen pro ml (Miller, 1972).

3.2.2.4 Stichagartest

Der Stichagartest dient zur Untersuchung der Motilität von Bakterien. Dafür wurden Kulturröhrchen mit Medium und 0,2 % Agar vorbereitet. Die Kulturen für den Stichagartest wurden, mit oder ohne Plasmid, bis zur exponentiellen Phase inkubiert, entsprechend induziert und weitere 3 h bei 37°C inkubiert. Die Stichagarröhrchen wurden mit einem sterilen Draht mit den Kulturen durch einen Stich in die Mitte angeimpft. Die Röhrchen wurden über Nacht bei 30°C inkubiert.

Stichagarmedium: 5 g NaCl, 10 g Pepton, 3 g Fleischextrakt, 2 g Agar/L

3.2.2.5 Schwärmassay

Die Schwärmassays wurden zur Analyse der Fortbewegung durch Flagellen durchgeführt. Dafür wurden Petrischalen mit Schwärmagar (0,32 %) vorbereitet. Diese wurden mit 1 µl der jeweiligen Kultur durch leichtes Anpieksen in der Mitte angeimpft. Die Kulturen wurden unter denselben Bedingungen wie für den Stichagartest (3.2.2.4) angezogen. Die Platten wurden über Nacht bei 30°C inkubiert. Der Schwärmradius der Bakterien konnte anschließend ausgemessen werden.

Schwärmmedium: 5 g NaCl, 10 g Pepton, 3 g Fleischextrakt, 3,2 g Agar /L

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Gesamtproteinisolierung aus *E. coli*

Die *E. coli*-Testkultur wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt und 1 ml der Kultur entnommen. Nach einer dreiminütigen Zentrifugation (13000 rpm, RT) wurde das Zellpellet in 80 µl SDS Probenpuffer und 30 mM DTT aufgenommen und die Probe 5 min bei 95°C erhitzt. Im Anschluss konnte die gelelektrophoretische Auftrennung folgen (3.2.3.4).

3.2.3.2 Acetonfällung von Proteinen

Die Fällung von Proteinen erfolgte durch Zugabe von 4 Volumenanteilen Aceton zu den entsprechenden Proben. Nach einer Inkubation über Nacht bei -20°C wurde der Ansatz 20 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (13000 rpm, 4°C) und der Überstand abgenommen. Das Sediment wurde 5 min in einem Speed-Vac Konzentrator getrocknet. Die Proteine wurden in 20 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und 15 µl des Ansatzes gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.2.3.4).

3.2.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Proteinproben wurde mit Hilfe des Reagenz Roti-Nanoquant (Roth) durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine modifizierte Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976). Dazu wurden 50 µl einer verdünnten Proteinprobe mit 200 µl des Reagenz vermischt und der Quotient aus der OD₅₉₀ und der OD₄₅₀ bestimmt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch den Vergleich mit einer vorher angefertigten BSA-Eichgerade (0,1 bis 1,6 mg/ml).

3.2.3.4 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese

Die denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Im 3%igen Sammelgel wurden die Proteine auf eine gemeinsame Laufhöhe gebracht. Je nach Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine variierte die Polyacrylamidkonzentration des Trenngels zwischen 10 % und 15 %. Die Proben wurden mit Probenpuffer und 30 mM DTT versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden 10 bis 20 µl auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Auftrennung des Proteingemischs erfolgte in SDS-Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 150 V.

Die Visualisierung der entstandenen Proteinbanden erfolgte je nach Versuchsziel entweder durch Coomassie- (3.2.3.5) oder Silberfärbung (3.2.3.6), bzw. Western Blot (3.2.3.7) mit anschließender Immundetektion.

Tab. 3-13 Zusammensetzung für Polyacrylamidgele

Komponente	Trenngel			Sammelgel
	10 %	12 %	15 %	
Puffer A	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
Puffer B	-	-	-	2,5 ml
Acrylamid Rotiphorese Gel 30	3,3 ml	4,0 ml	5,0 ml	2,2 ml
A. dest.	4,2 ml	3,5 ml	2,5 ml	5,5 ml
TEMED	10 µl	10 µl	25 µl	20 µl
10 % APS	25 µl	25 µl	10 µl	40 µl

Puffer A

1,5 mM Tris-HCl, pH 8,8

0,4 % (w/v) SDS

Puffer B

0,5 mM Tris-HCl, pH 6,8

0,4 % (w/v) SDS

4 x SDS-Probenpuffer

0,2 M Tris-HCl pH 6,8

8 % (w/v) SDS

40 % (v/v) Glycerol

0,004 % (w/v) Bromphenolblau

10 x SDS-Laufpuffer

333 mM Tris-HCl; pH 8,3

1 % (w/v) SDS

3.2.3.5 Coomassie-Färbung

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine konnten durch Coomassie-Blau angefärbt werden. Dazu wurde die Färbemethode nach Fairbanks *et al.* leicht modifiziert durchgeführt (Fairbanks *et al.*, 1971). Das Gel wurde für 1 min in Lösung A in der Mikrowelle erhitzt (400 W) und 5 min bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Anschließend wurde das Gel für jeweils 1 min in Lösung B und Lösung C kurz aufgekocht und in Lösung D für mindestens 1 h entfärbt.

Lösung A

25 % Isopropanol

10 % Essigsäure, (v/v)

0,05 % Coomassie Blau R-250, (w/v)

Lösung B

10 % Isopropanol

10 % Essigsäure, (v/v)

0,005 % Coomassie Blau R-250, (w/v)

Lösung C

10 % Essigsäure, (v/v)

0,002 % Coomassie Blau R-250, (w/v)

Lösung D

10 % Essigsäure, (v/v)

3.2.3.6 Silberfärbung

Die Silberfärbung erfolgte nach Blum (1987) und wurde aufgrund ihrer hohen Sensitivität bei Proteinproben geringer Konzentration angewandt.

Das SDS-Gel wurde in einer Schale mit 200 ml Fixierlösung 30 min leicht geschüttelt, danach zwei Mal für jeweils 10 min in 200 ml 30 % Ethanol und einmal für 10-60 min im gleichen Volumen destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel für 1 min in 200 ml 0,02 % Thiosulfatlösung inkubiert, worauf drei kurze Waschschriffe (à 20 s) mit destilliertem Wasser folgten. Nach 20-minütigem Schwenken in Silbernitratlösung wurde das Gel nochmals in destilliertem Wasser gewaschen (3 x 20 s) und in eine neue Schale mit Entwicklerlösung überführt. Je nach gewünschter Farbtintensität wurde es darin für wenige Sekunden bis mehrere Minuten geschüttelt. Das Gel wurde anschließend kurz mit destilliertem Wasser abgespült, für 10 min in Stopplösung inkubiert und nochmals in destilliertem Wasser gewaschen (3 x 10 min).

Fixierlösung

40 % EtOH

10 % Essigsäure

500 µl 37 % Formaldehyd auf 1 l

Silbernitratlösung

0,2 % Silbernitrat

75 µl 37 % Formaldehyd

auf 100 ml

Entwicklerlösung

3 % Na-Carbonat

0,0004 % Na-Thiosulfat

500 µl 37 % Formaldehyd auf 1 l

Stopplösung

50 mM EDTA

3.2.3.7 Western Immunoblotanalyse

Zum Nachweis spezifischer Proteinbanden wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mit einer Mini Trans-Blot Transfer Zelle (BioRad) auf eine PVDF- (Polyvinylidendifluorid) Membran (Hybond-P Membran 0,45 µm, Amersham Biosciences) übertragen. Vor dem Transfer der Proteine wurden das Trenngel und Filterpapier in Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde im ersten Schritt in 100 % Methanol für 1 min aktiviert, im zweiten Schritt für 5 min in H₂O inkubiert und im dritten Schritt für 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte für 1 h bei einer Spannung von 100 V in Transferpuffer. Proteinbanden aus NuPAGE Midi Gele wurden im Elektroblob-Verfahren (*Semi-Dry*) mit dem Trans-Blot SD von Biorad entsprechend den Herstellerangaben auf eine PVDF-Membran (Amersham) übertragen.

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran für 1 h bei RT auf dem Horizontalschüttler in Blockierungslösung inkubiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation der PVDF-Membran mit dem primären Antikörper. Durch dreimaliges Waschen (je 5-15 min) der Membran in TBST wurde der ungebundene Antikörper von der Membran entfernt. Der AP-gekoppelte Sekundärantikörper wurde ebenfalls für 1 h appliziert und durch dreimaliges Waschen (je 5-15 min) in TBS-T wieder entfernt. Zur Detektion der Proteinbanden wurde die Membran für 5 min in AP-Puffer geschwenkt und anschließend in Entwicklerlösung überführt. Dabei erfolgt eine enzymatische Umwandlung der AP-Substrate BCIP und NBT in blaue Farbstoffe. Die verwendeten Antikörper für die jeweiligen Western Immunoblotanalysen sind in den Tab. 3-4 und Tab. 3-5 aufgeführt.

Transferpuffer

15 mM Tris-HCl, pH 8,3

120 mM Glycin

0,2 % (w/v) SDS

20 % (v/v) Methanol

20x NuPAGE Transferpuffer

25 mM Bicine

25 mM Bis-Tris (freie Base)

1 mM EDTA

pH 7,2

1x NuPAGE Transferpuffer mit

10 % (v/v) Methanol versetzen

TBS T

30 mM Tris-HCl, pH 7,5

150 mM NaCl

0,05 % Tween20

AP-Puffer

100 mM Tris-HCl, pH 9,5

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂Entwicklerlösung

10 ml AP-Puffer

66 µl NBT (50 ng/ml in 70 % DMF)

33 µl BCIP (50 ng/ml in 100 % DMF)

3.2.3.8 β -Galaktosidase-Assay

Zur Charakterisierung der Promotoraktivität der Promotor-*lacZ*-Fusionsstämme (3.1.1) wurde die spezifische β -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Dafür wurden die Stämme unter verschiedenen Bedingungen kultiviert.

Die Vorkulturen wurden bei 37°C über Nacht in NZA-Medium inkubiert und 1:20 in M9-Medium oder 1:50 in die entsprechenden anderen Medien überimpft. Wenn möglich wurden die Kulturen bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 oder über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die β -Galaktosidaseaktivität bestimmt.

Folgende Bedingungen wurden getestet:

Medien:	M9- und NZA-Medium
Hitzeschock:	Kulturen wurden bei 28°C bis zu einer OD ₆₀₀ von 0,3-0,5 inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 43°C für 30 min → Messung der β-Galaktosidaseaktivität
Kälteschock:	Kulturen wurden bei 37°C bis zu einer OD ₆₀₀ von 0,3-0,5 inkubiert. Anschließend erfolgte der Kälteschock bei 15°C für 3 h bzw. 5 h
Osmotischer Schock:	Niederosmolares Medium: 1/6 der Bestandteile des NZA-Mediums Hochosmolares Medium: NZA-Medium + 500 mM NaCl
Oxidativer Stress:	Die Kulturen wurden bei 37°C bis zu einer OD ₆₀₀ von 0,3 inkubiert, mit 4 mM H ₂ O ₂ versetzt und für weitere 2 h bzw. über Nacht inkubiert
Detergenzien:	NZA-Medium mit 0,5 % SDS und 0,5 mM EDTA

Für die Messung der β-Galaktosidaseaktivität wurde 1 ml der Kultur bei 4°C und 10000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Z-Puffer resuspendiert und bei 4°C und 10000 rpm für 10 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde erneut wiederholt und im Anschluss das Pellet in 1 ml Z-Puffer resuspendiert. Die OD wurde bei 600 nm gemessen. Zur Messung der β-Galaktosidaseaktivität wurde die Suspension 1:100 oder 1:200 mit Z-Puffer auf ein Volumen von 500 µl verdünnt. Um die Zellen aufzuschließen, wurden 25 µl 0,1 % SDS und 25 µl Chloroform zugegeben, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde ONPG (o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid, 4 mg/ml in Z-Puffer) zugegeben. Die Reaktion wurde nach Erreichen einer gewünschten Gelbfärbung mit 250 µl 1 M Na₂CO₃ gestoppt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für 5 min wurden 750 µl abgenommen und die Intensität des Farbumschlags durch die Messung der Extinktion bei 420 nm bestimmt.

Die spezifische β -Galaktosidaseaktivität in mmol/min ml ergibt sich aus:

$$\frac{\Delta E_{420} \times Vol_{End}}{OD_{600} \times t \times d \times \varepsilon \times Vol_{Zellen}}$$

ΔE_{420} : gemessene Extinktionsänderung der Reaktionslösung bei 420 nm

OD_{600} : optische Dichte der Bakterienkultur bei 600 nm

Vol_{End} : Endvolumen des Reaktionsansatzes

Vol_{Zellen} : eingesetztes Volumen des Kulturüberstands

t: Reaktionszeit in Minuten

d: Schichtdicke der Küvette (1 cm)

ε : Extinktionskoeffizient von o-Nitrophenol ($0,0045 \text{ ml} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

Z-Puffer

60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

10 mM KCl

1 mM $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

3.2.3.9 Kalter osmotischer Schock

Der kalte osmotische Schock nach Neu und Heppel (1964) wurde durchgeführt, um periplasmatisches Extrakt für die Substratsuche zu gewinnen.

50 ml der gewünschten Kultur wurden bei 4000 xg für 10 min abzentrifugiert und die geernteten Bakterien mit 5 ml Puffer I gewaschen. Das gewonnene Pellet wurde in 2,5 ml Puffer II resuspendiert, unter Rühren langsam mit 2,5 ml Puffer III versetzt und für weitere 15 min kontinuierlich gemischt. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert (4000 xg, 20 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zügig in 2,5 ml eiskaltem Puffer IV resuspendiert, 10 Minuten auf Eis gerührt und schließlich bei 4000 xg und 4°C für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand, welcher die periplasmatischen Bestandteile enthält, wurde abgenommen und zur Reinigung nochmals zentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Aliquots bei -80°C gelagert.

Puffer I

10 mM Tris-HCl, pH 7.3

30 mM NaCl

Puffer II

30 mM Tris-HCl, pH 7.3

Puffer III

40 % Saccharose in

30 mM Tris-HCl, pH 7.3

0,5 mM EDTA

Puffer IV0,5 mM MgCl₂3.2.3.10 Membranpräparation

Die im Folgenden beschriebene Präparation wurde zur Gewinnung von Innen- und Außenmembranproteinen durchgeführt.

50 ml Bakterienkultur wurden hierfür 10 min bei 6000 xg und 4°C zentrifugiert, das Pellet in 40 ml 100 mM NaCl gewaschen und anschließend in 15 ml 10 mM HEPES, pH 7.4 resuspendiert. Nach der Zugabe von DNase (1:1000) wurden die Proben über den Mikrofluidizer aufgeschlossen. Ein sich daran anschließender 10minütiger Zentrifugationsschritt bei 16000 xg sollte Zelltrümmer entfernen. Der verbleibende Überstand wurde bei 45000 rpm für 45 min und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 2 ml 10 mM HEPES, pH 7.4 resuspendiert, mit 40 µl N-Lauroylsarcosin gemischt und über Nacht bei 4°C gerührt.

Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt von 45 min bei 45000 rpm und 4°C wurde der Überstand abgenommen (Innenmembranfraktion) und das Pellet (Außenmembranfraktion) mit 3 ml 10 mM HEPES, pH 7.4 gewaschen. Die pelletierten Außenmembranproteine wurden schließlich in 200 µl 10 mM HEPES, pH 7.4 aufgenommen und, wie die Innenmembranfraktion, bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.3.11 Reinigung von YfgC mit His-Tag

Anzucht des Überexpressionsstamms JB14 mit pCL2 (*yfgC*/pCS19)

4 L NZA-Medium wurden mit Hilfe einer üN-Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 bei 20°C, 200 rpm inkubiert. Die Kultur wurde mit 100 µM IPTG induziert und daraufhin bei 28°C und 180 rpm über Nacht inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (6000 x g, 4°C, 15 min) sedimentiert.

Präparativer Aufschluss der Bakterienzellen

Die sedimentierten Bakterien wurden in 30 ml kaltem Lysispuffer resuspendiert und mit DNase (Endkonzentration 0,5 mg/ml) versetzt. Der Aufschluss erfolgte am Mikrofluidizer M 110L bei einem Druck von 12 bar.

Reinigung über die FPLC-Anlage

Nach dem Zellaufschluss wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (16000 x g, 4°C, 30 min) sedimentiert. Das geklärte Lysat wurde anschließend auf eine Ni-NTA-Säule und danach über ein HAPS (Hydroxyapatit)-Säule an der FPLC-Anlage aufgetragen. Alle weiteren Reinigungsschritte sowie das Vorgehen können dem Abschnitt 4.1.1 entnommen werden.

Dialyse der gereinigten Fraktionen

Nach beiden Reinigungs-Läufen erfolgten, nach dem Aufkonzentrieren über Vivaspin-Säulen (30000 MW, 3000 rpm, 4°C), drei Dialyseschritte für je 20 min in 1 L Dialysepuffer bei 4°C.

Lysispuffer

50 mM HEPES/NaOH
150 mM NaCl
pH 8,0

Dialysepuffer

50 mM HEPES/NaOH
50 mM NaCl
pH 8,0

3.2.3.12 Reinigung von YggG mit His-Tag

Anzucht des Überexpressionsstamms DH5 α mit pYggG (yggG/pASK-IBA2)

2 L NZA-Medium wurden mit Hilfe einer \bar{u} N-Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 bei 37°C, 180 rpm inkubiert. Die Kultur wurde mit 100 μ g/ml AHT induziert und daraufhin bei 28°C und 200 rpm für 3 h inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (6000 x g, 4°C, 15 min) sedimentiert.

Präparativer Aufschluss der Bakterienzellen

Die sedimentierten Bakterien wurden in 30 ml kaltem Lysispuffer resuspendiert und mit DNase (Endkonzentration 0,5 mg/ml) versetzt. Der Aufschluss erfolgte am Mikrofluidizer M 110L bei einem Druck von 12 bar.

Reinigung über die Ni-TED-Säulen

Nach dem Zellaufschluss wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (16000 x g, 4°C, 30 min) sedimentiert. Das geklärte Lysat wurde anschließend auf mit LEW äquilibrierte Ni-TED-Säulen aufgetragen. Alle weiteren Reinigungsschritte können dem Abschnitt 4.2.1 entnommen werden.

Dialyse der gereinigten Fraktionen

Nach der Reinigung über die Ni-TED-Säulen erfolgten, nach dem Aufkonzentrieren über Vivaspin-Säulen (5000 MW, 3000 rpm, 4°C), drei Dialyseschritte für je 20 min in 1 L Dialysepuffer bei 4°C.

LEW-Puffer

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

pH 8,0

Dialysepuffer

50 mM NaH₂PO₄

100 mM NaCl

pH 8,0

3.2.3.13 Gelfiltration

Die multimere Organisation von YfgC bzw. YggG und potentiellen Interaktionspartnern kann durch die Gelfiltration bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde dafür eine Superdex 200 5/150 GL (Auftrennung im Bereich 3-600 kD) der Firma GE Healthcare eingesetzt. Es wurde die automatisierte FPLC-Anlage Äkta von GE Healthcare verwendet. Die Säulen wurden vor der Gelfiltration mit Laufpuffer mit einer Flussrate 0,1 ml/min äquilibriert. Das Auftragsvolumen der Proben betrug 20 µl und es wurden Proteinkonzentrationen zwischen 10 und 12 µg/µl eingesetzt. Die Eichung der Säulen erfolgte nach Anleitung des Gelfiltrationskalibrierungskits LMW & HMW von GE Healthcare.

Laufpuffer

50 mM NaH₂PO₄

150 mM NaCl

pH 8,0

3.2.3.14 Cross-Link Methode

Zur weiteren Untersuchung der oligomeren Zustände von YfgC und YggG mit und ohne potentielle Interaktionspartner wurde die Methode des Cross-Links eingesetzt. Dabei wurden 2-10 µM des entsprechenden Proteins mit und ohne potentiellen Interaktionspartner im Reaktionspuffer für 5, 15 und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe des Cross-Linkreagens Glutaraldehyd mit einer Endkonzentration von 0,1 % (v/v) erfolgte die Probenentnahme nach 2, 5, 15, 30 bzw. 60 und 120 min. Die Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe der Stopplösung unterbrochen und die Ansätze für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach einer 10minütigen Inkubation bei 40°C wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt (NuPAGE Novex Midi Gel, Invitrogen). Im Anschluss erfolgte eine Silberfärbung (3.2.3.6).

Reaktionspuffer

50 mM NaH₂PO₄

100 mM NaCl

pH 8,0

10x Stopplösung

1 M Tris-HCl; pH 7,5

Elektrophoresepuffer

89,5 g Tricin

60,6 g Tris Base

10 g SDS

A. dest. ad 500 ml

3.2.3.15 Abbau von Peptiden und Proteinen

Zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität von YfgC und YggG wurden unterschiedliche Substrate, Puffer, Konzentrationen und Reaktionszeiten eingesetzt, die in den jeweiligen Ergebnisteilen erwähnt sind. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließender Coomassie- oder Silberfärbung analysiert.

3.2.3.16 Zymogramm

Zur weiteren Substratsuche wurde eine Methode angewandt, bei der das zu testende Protein auf ein nicht denaturierendes Zymogramm-Gel aufgetragen wurde, das Casein oder Gelatine (0,1% w/v) enthielt. Der Abbau von Casein oder Gelatine wurde anschließend durch eine Casein- bzw. Gelatineanfärbung sichtbar gemacht. Das zu testende Protein wurde dafür mit Z-Probenpuffer versetzt, auf das Zymogramm-Gel aufgetragen und in TG-Laufpuffer für 100 min bei einer Spannung von 100 V elektrophoretisch getrennt. Anschließend wurde das Gel für 30 min bei Raumtemperatur in Renaturierungs-Puffer inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation in Entwicklungspuffer über Nacht bei 37°C. Nach der Entwicklung erfolgte die Färbung durch eine einstündige Inkubation in Färbelösung und durch eine abschließende Entfärbung für 30 bis 60 min in Entfärbelösung.

Z-Probenpuffer

62,5 mM Tris-HCl; pH 6,8

4 % (w/v) SDS

25 % (v/v) Glycerin

0,01 % (w/v) Bromophenolblau

TG-Laufpuffer

25 mM Tris-Base; pH 8,3

192 mM Glycin

0,1 % (w/v) SDS

A. dest. ad 500 ml

Renaturierungs-Puffer

2,5 % (v/v) Triton X-100

Entwicklungspuffer

50 mM Tris-HCl; pH 7,5

200 mM NaCl

5 mM CaCl₂

0,02 % (v/v) Brij-35

Färbelösung

40 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure

0,5 % (w/v) Coomassie-Blau R-250

Entfärbelösung

40 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure

3.2.3.17 Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Die Co-IP dient zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen und wurde in dieser Arbeit angewandt, um Substrate bzw. potentielle Interaktionspartner von YfgC und YggG zu ermitteln bzw. zu belegen.

Für die Co-IP in dieser Arbeit wurden Dynabeads® (Invitrogen) mit Protein G verwendet.

Für diesen Versuch wurden die Deletionsstämme zuvor mit den gewünschten Plasmiden bzw. mit dem Leervektor transformiert. Die zu untersuchende Kulturen wurden nach zweistündiger Inkubation bei 37°C mit 5 µM IPTG induziert und für weitere 3 h inkubiert.

Währenddessen wurden 50 µl Dynabeads® mit 200 µl PBS mit 0,01 % Tween und 10 µg Primärantikörper (Penta-His) für 1 h bei RT auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Von der zu untersuchenden Kultur wurde das Volumen abgenommen, das einer OD₆₀₀ von 0,8 entsprach, bei 13000 rpm für 3 min zentrifugiert und das Pellet mit 500 µl Co-IP-Puffer gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet erneut in 500 µl Co-IP-Puffer mit 0,7 µl DNase aufgenommen und zu 500 mg Glasperlen pipettiert. Zum Aufschluss der Zellen wurde diese Suspension für 1h bei 4°C und 1400 rpm im Thermomixer geschüttelt.

Von den Dynabeads® wurde mit Hilfe eines Magneten der Überstand entfernt und anschließend vorsichtig mit 200 µl PBS mit 0,01 % Tween gewaschen. Nach Aufschluss der Zellen wurde das Lysat vorsichtig von den Glasperlen getrennt und zu den vorbehandelten Dynabeads® gegeben. Nach einer Inkubation von 1-3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht

bei 4°C, wurden die Dynabeads® dreimal mit 200 µl PBS gewaschen und in 100 µl PBS aufgenommen. Die Dynabeads® wurden in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, der Überstand entfernt und in 20 µl 1x SDS-Probenpuffer mit 30 mM DTT resuspendiert. Die Proben wurden 5 min bei 95°C aufgekocht und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach der gelelektrophoretischen Trennung erfolgte entweder eine Silberfärbung oder ein Western Blot mit anschließender Immundetektion des nachzuweisenden Proteins.

3.2.3.18 Massenspektrometrische Analysen

Die massenspektrometrischen Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Patrick Hauske, CGC, Dortmund durchgeführt. Zur Massenbestimmung mittels Elektrospray-Ionisationsmethode (ESI) wurden die Messungen zunächst zwei Minuten isokratisch mit 20 % AcN / 80 % Wasser und dann mit einem Gradienten über zehn Minuten auf 100% AcN durchgeführt. Die mobilen Phasen (Laufmittel) waren mit 0,1 % Ameisensäure versetzt. Zur Auftrennung wurde die Säule Jupiter C4 5 µm 300 Å mit 50 x 4,60 mm Durchmesser von Phenomenex verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Die Metalloprotease YfgC

4.1.1 Reinigung von YfgC

Für die Reinigung wurde YfgC mit His-Tag in *E. coli* JB14-Zellen überproduziert (3.2.3.11). Nach Zellaufschluss erfolgte die Reinigung von YfgC über die FPLC-Anlage. Im ersten Schritt wurde der Überstand des Zelllysats durch Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA-Säule getrennt. Die anschließende Elution erfolgte dabei mit einem Imidazolgradienten, ansteigend von 0-200 mM Imidazol und einer Flussrate von 4 ml/min. Die Fraktionen wurden gesammelt, 10 µl stichprobenartig entnommen und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung überprüft. Abb. 4-2 zeigt das UV-Spektrum des Ni-NTA-Laufs und Abb. 4-2 das dazugehörige Coomassiegel. Im Überstand (Ü) ist eindeutig eine Induktion von YfgC zu erkennen. Der nachfolgende Waschlauf mit Lysispuffer zeigt in der Durchlauf- und Waschfraktion (D+W) die Entfernung von Verunreinigungen und geringen Mengen YfgC. Die Elutionsfraktionen 14-28 zeigen die Entfernung weiterer Verunreinigungen. Ab Fraktion 35 eluiert das gereinigte YfgC.

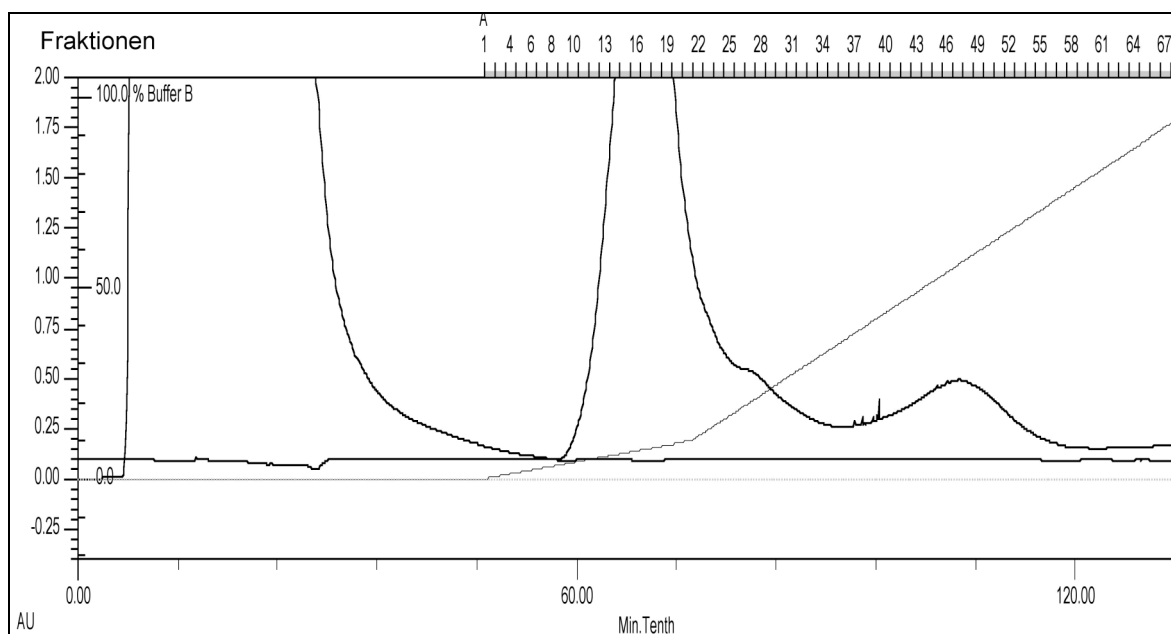


Abb. 4-1: UV-Spektrum des Ni-NTA-Laufs. Die Abbildung zeigt den Reinigungslauf von YfgC über die Ni-NTA-Säule, oberhalb des Spektrums sind die Fraktionen des Kollektors dargestellt, die mittels SDS-Page kontrolliert wurden. Die Y-Achse gibt die AU (Absorbance Units) und die X-Achse die Minuten des Lauf an.

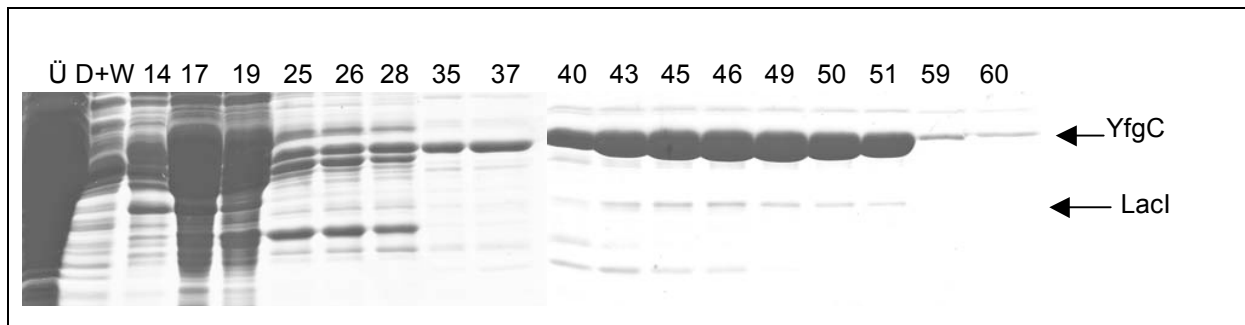


Abb. 4-2: Reinigung von YfgC über Ni-NTA. Der Ni-NTA-Lauf wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Angefangen mit der Probe vor Auftrag auf die Säule Ü (Überstand), des Durchflusses und Wachschriffs mit Laufpuffer (D+W) und der Fraktionen des Elutionsschritts stichprobenartig ab 14 bis 60 (siehe auch UV-Spektrum Abb. 4-1); mit Pfeilen gekennzeichnet sind YfgC (50 kDa) und der Lac-Repressor (38 kDa) Laufpuffer: 50 mM HEPES/NaOH, 150 mM NaCl pH 8,0 Elutionspuffer: Laufpuffer + 200 mM Imidazol.

Die YfgC-Fraktionen enthielten nach dem ersten Reinigungsschritt noch Verunreinigungen bei ca. 38 kDa. Western Blot-Analysen ergaben, dass es sich dabei um den Lac-Repressor (LacI) aus dem Vektor pCS19 handelt. Um diesen zu entfernen wurden die aufkonzentrierten und dialysierten YfgC-Fraktionen in einem zweiten Schritt über eine Hydroxyapatitsäule (HAPS), ebenfalls mit einem Gradienten von 0-100 % Puffer B, gereinigt (Abb. 4-3). Die Kontrolle der Fraktionen erfolgte wieder stichprobenartig mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung (Abb. 4-4). In den Fraktionen 9-15 eluierten weitere Verunreinigungen von der Säule, die Fraktionen 18-24 zeigen die stärksten YfgC-Konzentrationen ohne Lac-Repressor. Ab Fraktion 30 ist zusätzlich eine Bande bei ca. 38 kDa zu sehen, bei der es sich wahrscheinlich um den Lac-Repressor handelt.

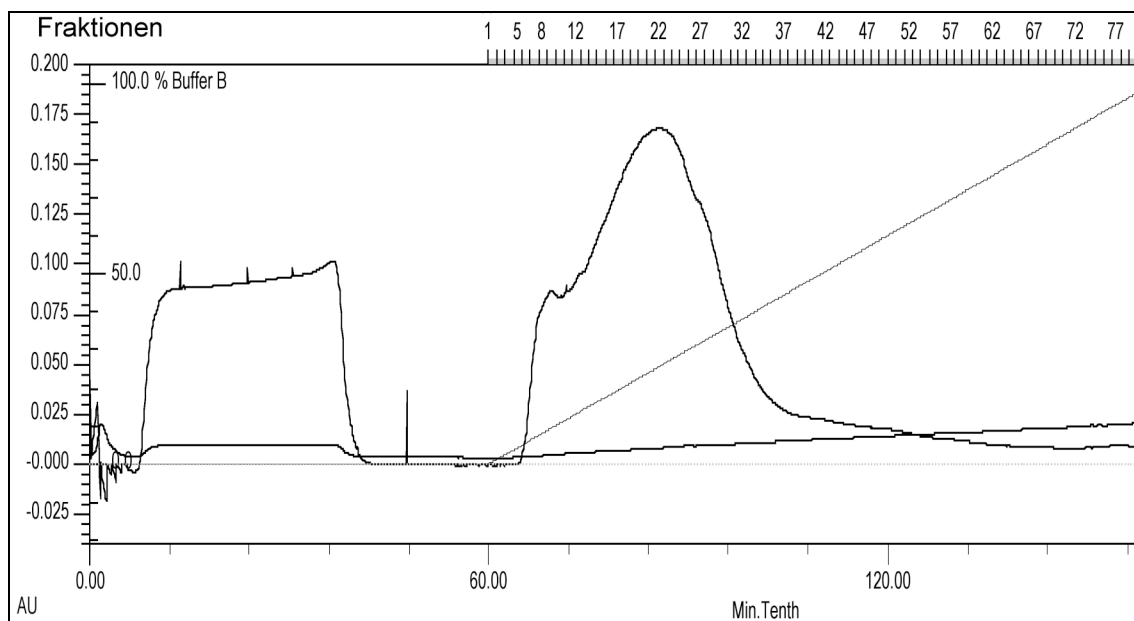


Abb. 4-3: UV-Spektrum des HAPS-Laufs. Die Abbildung zeigt den Reinigungslauf von YfgC über die Hydroxyapatitsäule (HAPS), oberhalb des Spektrums sind die Fraktionen des Kollektors dargestellt. Die Y-Achse gibt die AU (Absorbance Units) und die X-Achse die Minuten des Lauf an.

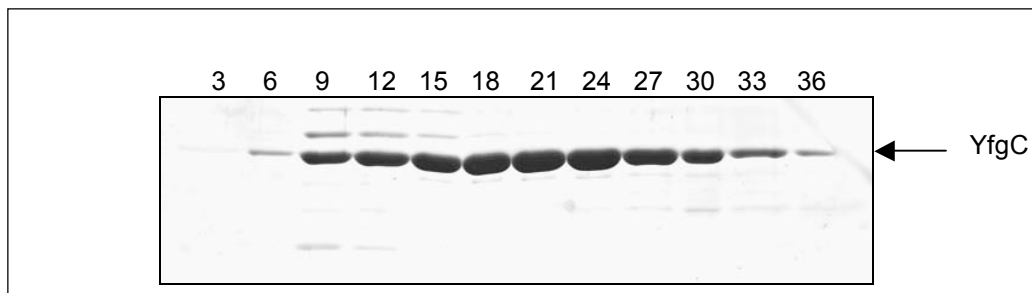


Abb. 4-4: Reinigung von YfgC über HAPS. Die Abbildung zeigt die SDS-PAGE-Analyse des HAPS-Laufs. Aufgetragen wurden stichprobenartig die Fraktionen 3-36 (siehe auch UV-Spektrum Abb. 4-3); mit einem Pfeil gekennzeichnet ist YfgC (50 kDa). Verwendete Puffer sind Laufpuffer A: 50 mM HEPES/NaOH, 50 mM NaCl, pH 8,0 und Laufpuffer B: 50 mM HEPES/NaOH, 50 mM NaCl, 500 mM Kaliumphosphat (4 g KH_2PO_4 , 82 g $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{L}$)

Nachdem die Fraktionen konzentriert und dialysiert wurden, erfolgte eine weitere Überprüfung mittels Western Blot Analyse. Dies diente dem Nachweis von YfgC und zusätzlich der Untersuchung des Lac-Repressor-Gehalts. Der Western Blot und die Immundetektion erfolgten wie unter 3.2.3.7 beschrieben.

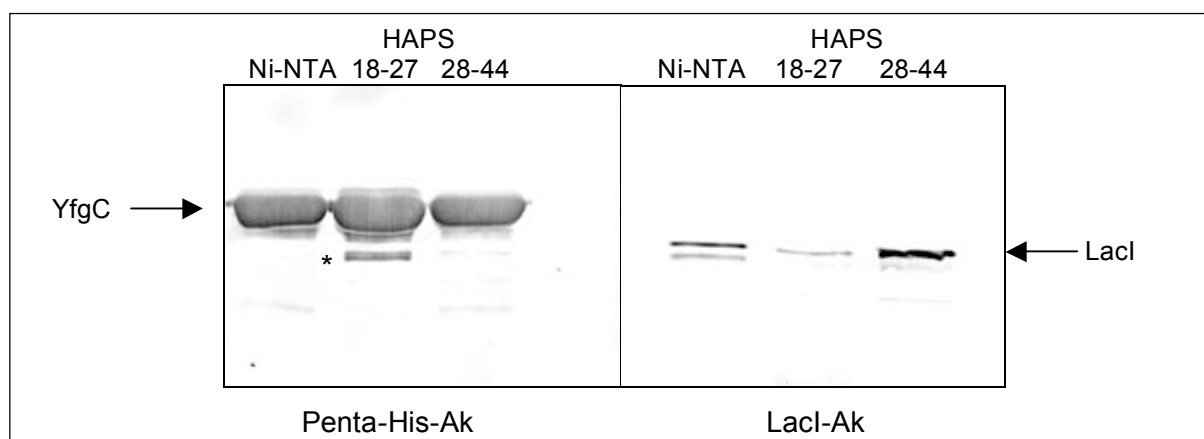


Abb. 4-5: Western Blot der YfgC Reinigung. Zur Kontrolle der Reinigung von YfgC, wurden die vereinigten Ni-NTA-Fraktionen und die vereinigten HAPS-Fraktionen 18-27 und 28-44 aufgetragen. In der Probe 18-27 befindet sich auf dem Western Blot mit Penta-His-Ak, mit Stern gekennzeichnet, eine Abbaubande. Links Penta-His-Ak 1:5000; Rechts LacI-Ak 1:1000

Der Western Blot mit Penta-His-Antikörper (Abb. 4-5) zeigt die Ni-NTA-Fraktion von YfgC vor dem Auftragen auf die HAPS und die zwei vereinigten Elutionsfraktionen 18-27 und 28-44. Die Probe 18-27 weist unterhalb der Hauptbande eine leichte Abbaubande auf (mit Stern gekennzeichnet), die vom Penta-His-Antikörper mit erfasst wird. Diese ist nicht in der Probe 28-44 zu erkennen. Der Western Blot zur Kontrolle des Lac-Repressors zeigt, dass die Probe 18-27 den geringsten Gehalt an LacI besitzt und somit die Reinste ist. Dagegen ist der Hauptanteil des Lac-Repressors in der Fraktion 28-44 eluiert. Insgesamt wurden 13 mg der Fraktion 18-27 gereinigt.

4.1.2 In vitro Charakterisierung

4.1.2.1 Oligomerisierung von YfgC

Viele Proteine weisen höhere Oligomerisierungszustände auf, die z.B. für die Protease DegP vom Hexamer über das Dodecamer bis hin zum 24-mer reichen können (Krojer *et al.*, 2002; Clausen *et al.*, 2002; Merdanovic *et al.* 2010). Für YfgC wurden bisher noch keine Untersuchungen bezüglich des oligomeren Zustands durchgeführt, deshalb sollte mittels Gelfiltration der Oligomerisierungszustand des gereinigten Proteins *in vitro* ermittelt werden. Dazu wurden ca. 250 µg gereinigtes YfgC eingesetzt und wie unter 3.2.3.11 beschrieben analysiert.

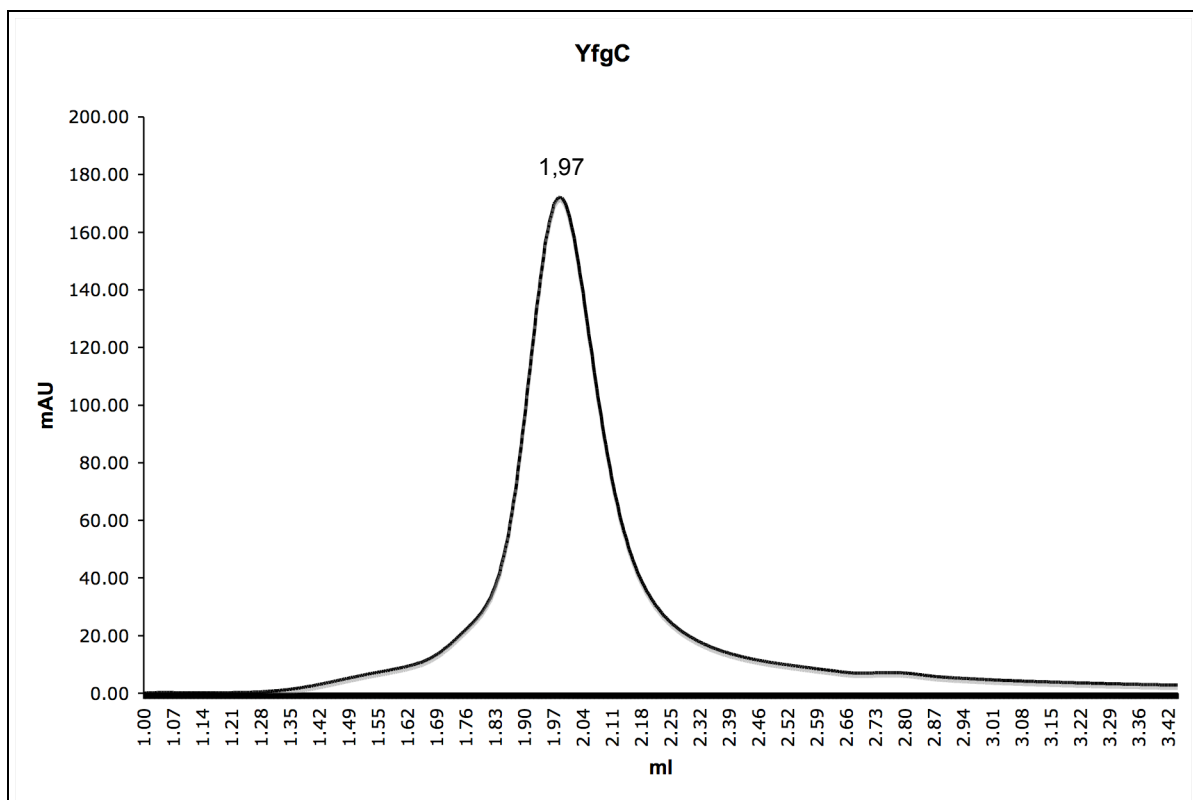


Abb. 4-6: Gelfiltration von gereinigtem YfgC. Die Abbildung zeigt den Lauf der Gelfiltration von YfgC über die Säule Superdex 200 5/150 GL, das Elutionsvolumen ist oberhalb des 'Peaks' vermerkt. Die Y-Achse gibt die mAU 'milli absorbance units' und die X-Achse das Elutionsvolumen in ml an.

Die Gelfiltration (Abb. 4-6) zeigt, dass YfgC mit einem Volumen von 1,97 ml von der Säule eluiert. Nach Berechnungen unter Einbeziehung der Kalibrierungsgerade entspricht das einem Molekulargewicht von 45,19 kDa. Das gereinigte YfgC besitzt eine Größe von ca. 50 kDa. Daraus ergibt sich, dass YfgC *in vitro*, ohne die Gegenwart eines Substrats, als Monomer vorliegt.

4.1.2.2 Substratsuche

YfgC ist eine uncharakterisierte Protease, deshalb wurde zur weiteren Untersuchung eine Reihe von bekannten Protease-Substraten getestet. Als universelle Substrate wurden Malat-Dehydrogenase, ein Caseingemisch, α -Casein und β -Casein eingesetzt. Die jeweiligen Proteolyseansätze wurden in verschiedenen Reaktionspuffern (NaH_2PO_4 und Tris) bei 37°C und 43°C für 1 h, 3 h und über Nacht inkubiert. Die Kontrolle erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung (Ergebnisse nicht gezeigt). Zusätzlich wurde ein Casein- und Gelatine-Zymogramm durchgeführt (3.2.3.14). Keines dieser getesteten Substrate wurde durch YfgC proteolysiert.

Die oxidierte Insulin β Chain ist ein Substrat der periplasmatischen Metalloprotease PtrA (Becker und Roth, 1993), deshalb wurde getestet, ob auch die Metalloprotease YfgC in der Lage ist dieses potentielle Substrat umzusetzen. Der Proteolyseansatz der Insulin β -Untereinheit wurde bei 28°C, 37°C und 43°C für 18 h inkubiert und mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung kontrolliert (Ergebnisse nicht gezeigt). Unter keiner der getesteten Bedingungen war ein Abbau zu erkennen.

Um eine große Variation an möglichen Substraten zu testen, wurden FRET-Peptidbibliotheken eingesetzt. Bei einem Schnitt würde das Fluorophor Nma vom Quencher Dnp getrennt und eine Fluoreszenz wäre messbar. Jedoch wurde keins der getesteten FRET-Substrate durch YfgC abgebaut.

Eingesetzte FRET-Peptidbibliotheken:

D-A2pr(Nma)-Gly-[Phe/Ala/Val/Glu/Arg]-[Pro/Tyr/Lys/Ile/Asp]-**Leu**-Ala-Phe-Pro-Lys(Dnp)-D-Arg-D-Arg
D-A2pr(Nma)-Gly-[Phe/Ala/Val/Glu/Arg]-[Pro/Tyr/Lys/Ile/Asp]-**Val**-Ala-Phe-Pro-Lys(Dnp)-D-Arg-D-Arg
D-A2pr(Nma)-Gly-[Phe/Ala/Val/Glu/Arg]-[Pro/Tyr/Lys/Ile/Asp]-**Phe**-Ala-Phe-Pro-Lys(Dnp)-D-Arg-D-Arg

Des Weiteren wurden verschiedene pNA (-p-Nitroanilin)-Substrate der periplasmatischen Protease DegP und deren humanem Homolog HtrA1 getestet (Tab. 4-1). YfgC zeigte auch bei den unten aufgeführten Substraten keinerlei Aktivität.

DegP-Substrate	HtrA1-Substrate
SPLPEGV-pNA	FANQHLCGSHLVEA-pNA
SKAKKGEEPLPEGV-pNA	KSKIGSTENL-pNA
STDGGV-pNA	VYKPVDLSKV-pNA
SPAKGGEEPLPEGV-pNA	TFRENAKA-pNA
SPMFKGV-pNA	KHQPGGGKV-pNA
	PGGGNKKIETHKL-pNA

Tab. 4-1: pNA (p-Nitroanilin)-Substrate

4.1.3 In vivo Charakterisierung

4.1.3.1 Nachweis von YfgC im Periplasma

YfgC gehört laut bioinformatischen Vorhersagen zur Familie M48, die viele Transmembranproteasen umfasst. YfgC besitzt nach den Berechnungen einiger Datenbanken DAS (URL: <http://www.sbc.su.se>) und TMPred (URL: <http://www.ch.embnet.org>) drei Transmembrandomänen, während andere Datenbanken wie echoBase, ecogene (URL: www.prfect.org), SOSUI (URL: bp.nuap.nagoya-u.ac.jp) und TMHMM (URL: www.cbs.dtu.dk) prognostizieren, dass YfgC periplasmatisch ist bzw. keine Transmembrandomänen enthält. Zur Aufklärung der tatsächlichen Lokalisierung von YfgC wurden vom Wildtypstamm BW30270 Fraktionen der unterschiedlichen Zellkompartimente hergestellt. Der Nachweis von YfgC erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse.

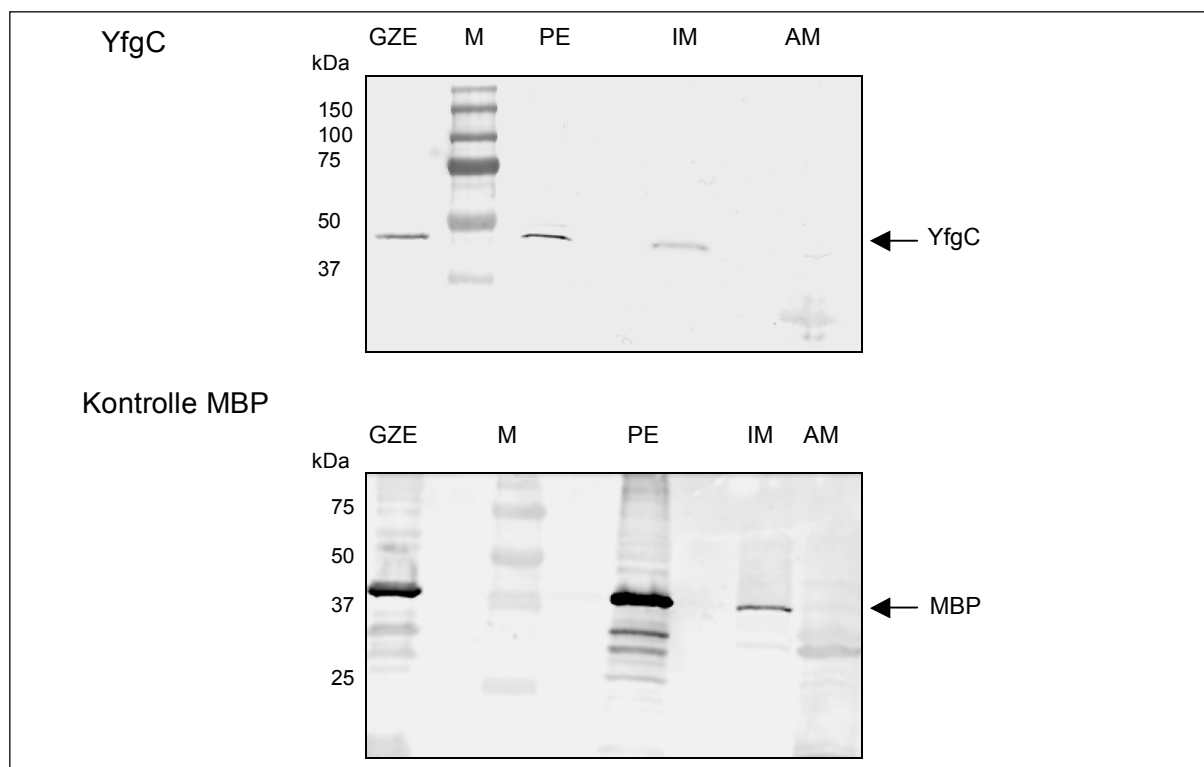


Abb. 4-7 : Western Blot YfgC-Nachweis. Alle Fraktionen wurden aus dem Stamm BW30270 (Wildtyp) gewonnen. Aufgetragen wurden GZE: Ganzzelleextrakt (Herstellung siehe 3.2.3.1), PE: periplasmatischer Extrakt (Herstellung siehe 3.2.3.9), IM: Innenmembran (Herstellung siehe 3.2.3.10) und AM: Außenmembran (Herstellung siehe 3.2.3.10). Der Nachweis erfolgte mit dem YfgC-Ak 1:20000, als Kontrolle wurde MBP (Maltose Binde Protein MalE) nachgewiesen, MBP-Ak 1:20000. M:Marker

Wie der Western Blot zeigt (Abb. 4-7), ist YfgC ein periplasmatisches Protein. Der geringe Teil an YfgC, der in der Innenmembranfraktion vorliegt, ist auf die Präparation zurückzuführen, da auch der Kontroll-Western Blot von MBP, einem periplasmatischen Protein, eine schwache Bande aufweist. Die Außenmembranfraktion zeigt hingegen eindeutig, dass kein YfgC in diesem Zellkompartiment vorliegt.

4.1.3.2 β -Galaktosidaseassay

Um die physiologische Bedeutung von YfgC zu ermitteln wurden transkriptionelle Promotor-*lacZ*-Fusionen hergestellt (3.2.1.5). Transkriptionelle *lacZ*-Fusionen werden vielseitig zur Messung von Promotoraktivitäten und Expressionsstärken eingesetzt, da die gemessene β -Galaktosidaseaktivität direkt mit der Promoteraktivität des Zielgens korreliert. Zur Ermittlung der Promotorstärke von *yfgC* wurde daher die β -Galaktosidaseaktivität der *yfgC*-Promotor-*lacZ*-Fusion (3.2.1.5 und 3.2.3.8) im Vergleich zu anderen Promotoren untersucht. Diese Promotor-*lacZ*-Fusionen stammen von den Genen *malT*, (positiver Regulator des Maltoseregulons) mit niedriger Transkriptionsrate, und *malK* (Teil des Maltoseregulons) mit hoher Transkriptionsrate (Bukau *et al.*, 1986).

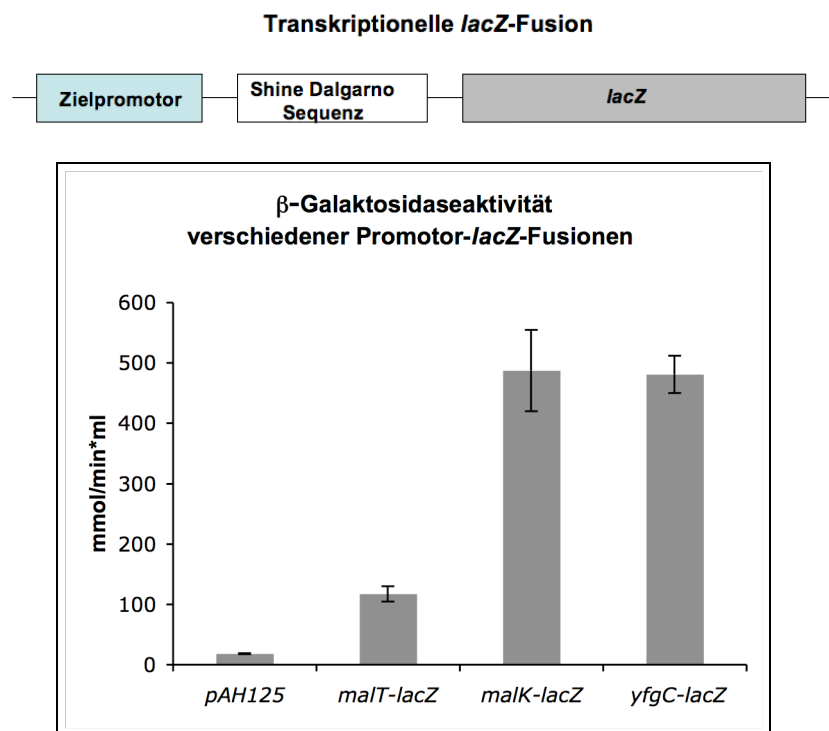


Abb. 4-8: Promotorstärke von *lacZ*-Fusionen. Oben: Schematische Darstellung der Promotor-*lacZ*-Fusionen. Unten: Vergleich der β -Galaktosidaseaktivität der Promotor-*lacZ*-Fusionen von *malT*, *malK*, *yfgC* und der Kontrolle pAH125 (Kontrollstamm mit CRIM-Plasmid-Integration ohne fremden Promotor). Die Standardabweichung ist Resultat aus drei Messungen.

Die Ergebnisse des β -Galaktosidaseassays (Abb. 4-8) zeigen, dass *yfgC* einen starken Promotor besitzt. Die Promotorstärke ist vergleichbar mit der von *malK*, dessen Genprodukt als Teil eines ABC-Transporter-Komplexes am Maltoseimport beteiligt ist (Kühnau *et al.*, 1991) und eine hohe Transkriptionsrate besitzt. Ein starker Promotor sagt jedoch noch nichts über die Bedingungen aus unter denen *yfgC* wichtig ist, deshalb wurde die Promotoraktivität untersucht.

Durch die Erforschung der Promotoraktivität kann festgestellt werden unter welchen Bedingungen die Transkription des *yfgC*-Promotors gesteigert ist. Deshalb wurde die *yfgC*-Promotor-*lacZ*-Fusion unter verschiedenen Wachstumsbedingungen getestet.

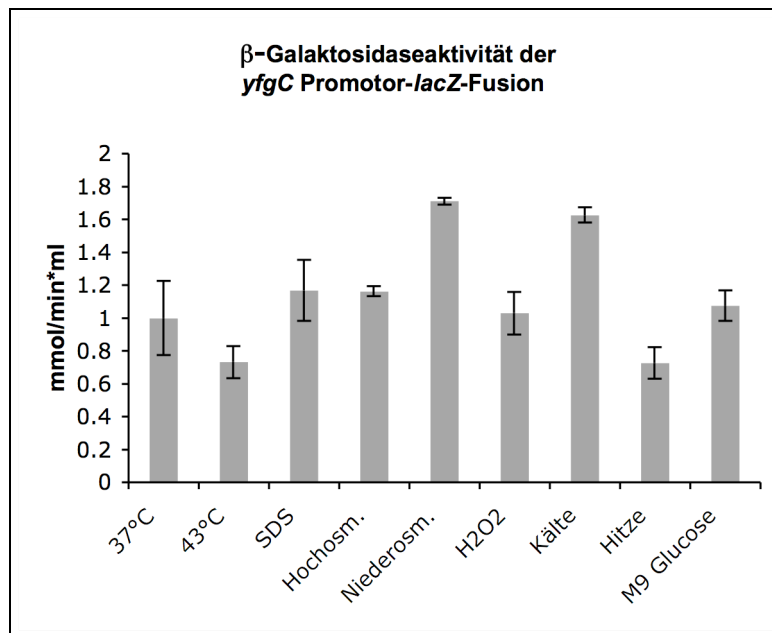


Abb. 4-9: Promotoraktivität von *yfgC* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Die β -Galaktosidaseaktivität der *yfgC* Promotor-*lacZ*-Fusion wurde bei verschiedenen Bedingungen untersucht. Getestete Bedingungen sind neben 37°C und 42°C, SDS: NZA + 0,5% SDS, Hochosmolares Medium: NZA + 500 mM NaCl, Niederosmolares Medium: 1/6 NZA, H₂O₂ (oxidativer Stress): NZA+ 4 mM H₂O₂, Kälte: 3 h bei 15°C, Hitze: 30 min bei 43°C, M9 Minimalmedium + 0,4 % Glucose. Die Kulturen wurden jeweils bis zur exponentiellen Phase inkubiert. Die Aktivität bei 37°C wurde gleich 1 gesetzt und entspricht 133,6 mmol/min*ml. Die Standardabweichung ist das Resultat aus drei Messungen.

Die Analyse der Promotoraktivität von *yfgC* bei verschiedenen Wachstumsbedingungen zeigte unter keinen der getesteten Bedingungen signifikante Unterschiede. Ein leichter Anstieg ist bei den Wachstumsbedingungen in niederosmolarem Medium und nach dem Kälteschock zu verzeichnen. Die β -Galaktosidaseaktivitäten sind dabei ca. doppelt so hoch wie bei den Bedingungen von 43°C und nach dem Hitzeschock, unter denen die Aktivität am niedrigsten ist. Eine Aussage über die Bedingungen, unter denen die Transkription des Promotors erhöht ist, lässt sich jedoch nicht treffen.

4.1.3.3 Mikroskopie von auffälligen *yfgC* Deletionsstämmen

Um *yfgC* in seiner Funktion weiter einordnen zu können wurden Knockoutstämme (Dissertation, J. Weski) dieses Gens, auch in Kombination mit anderen Genen, hinsichtlich ihrer Wachstumsbedingungen untersucht. Dabei erwies sich der Doppeldeletionstamm *surA yfgC* als interessant. Bei 37°C zeigte er ein normales Wachstum, bei 42°C wies der Stamm jedoch im Vergleich zum Wildtypstamm und der beiden Einzeldelentionsstämmen ein sehr schwaches Wachstum auf (Abb. 4-10).

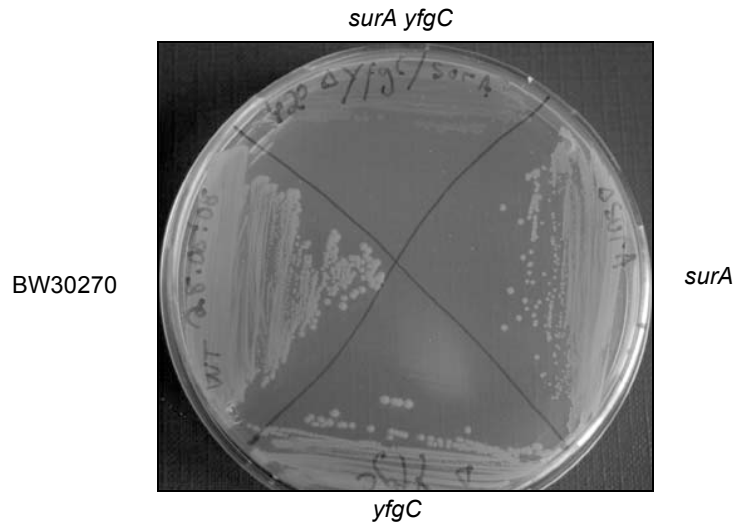


Abb. 4-10: Wachstum des *surA yfgC* Deletionsstamms bei 42°C. Das Wachstum des *surA yfgC* Deletionsstamms bei 42°C wurde verglichen mit dem Wildtyp BW30270 und den jeweiligen Einzeldelationen. Angegeben ist der relevante Genotyp.

Um diesen Phänotyp genauer zu analysieren wurden Flüssigkulturen des *surA yfgC* Stamms, sowie des Wildtyps und der Einzeldelationsstämme über Nacht bei 42°C inkubiert und anschließend mikroskopiert. Auf diesem Weg können Zellteilungsdefekte und veränderte Morphologien festgestellt werden.

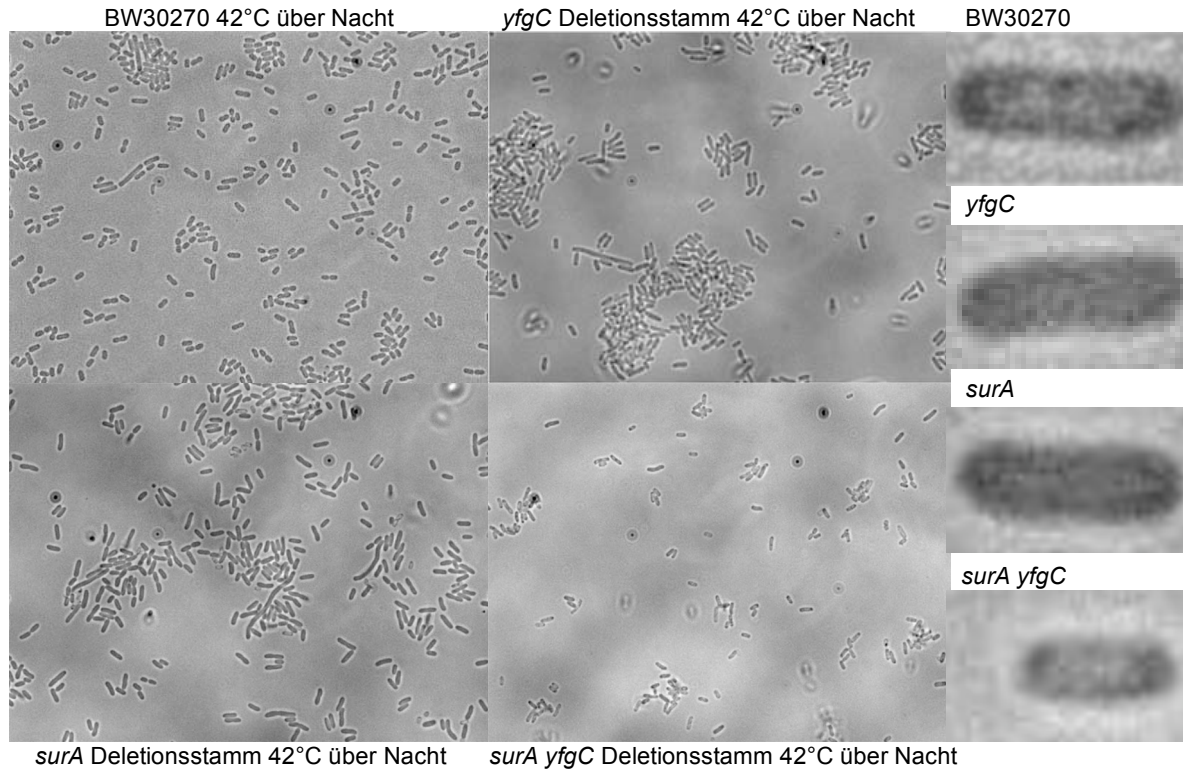


Abb. 4-11: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Wildtyp und Deletionsstämmen bei 42°C. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen des *surA yfgC* Deletionsstamms bei 42°C im Vergleich zum Wildtyp BW30270 und den jeweiligen Einzeldelationen erfolgten mit 100x-Vergrößerung. Angegeben ist der relevante Genotyp.

Alle Stämme wurden mit 100x-Vergrößerung aufgenommen. Die Zellen des Wildtyps und des *yfgC* bzw. *surA* Deletionsstamms weisen eine normale Morphologie auf. Dagegen sind die Zellen des *surA yfgC* Deletionsstamms um ca. 1/3 kleiner als die des Wildtypstamms bzw. der Einzeldelentionsstämme. Das weist daraufhin, dass dieser Stamm Wachstumsdefekte besitzt. Dadurch wird der Phänotyp bestätigt, der bereits in Abb. 4-10 zu erkennen war.

4.1.3.4 Komplementationsassay

Eine weitere Untersuchung des Wachstumsdefekts des *surA yfgC* Stamms erfolgte in Gegenwart der komplementierenden Plasmide. Dazu wurden die Stämme auf NZA-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C und 42°C inkubiert. Als Kontrollen wurden der Wildtypstamm BW30270 und der Doppeldeletionstamm ohne Plasmid und mit Leervektoren (pCS19 und pASK-IBA2) mitgeführt. Zusätzlich wurde der *surA yfgC* Stamm mit der inaktiven Mutante *yfgCE137Q* transformiert, um so Hinweise zur Funktion von YfgC zu erhalten.

Stamm/Genotyp	Vektor/Plasmid	37°C	42°C
BW30270	-	+++	+++
<i>surA yfgC</i>	-	+	-
<i>surA yfgC</i>	pCS19	+	-
<i>surA yfgC</i>	pASK	+	-
<i>surA yfgC</i>	<i>surA</i> /pASK	+++	+++
<i>surA yfgC</i>	<i>yfgC</i> /pCS19 (pCL2)	++	++
<i>surA yfgC</i>	<i>yfgCE137Q</i> /pCS19	++	++

Tab. 4-2: Wachstum der Stämme mit und ohne Vektor bzw. Plasmid; Alle Stämme die mit `+++` gekennzeichnet sind wuchsen so gut wie der Wildtyp, die Bezeichnung `++` weist auf ein geringfügig schlechteres Wachstum hin, die Kennzeichnung `+` deutet auf ein sichtbar schlechteres Wachstums hin und Stämme die nur noch wenige Kolonien aufweisen sind mit `-` gekennzeichnet

Der Komplementationsassay zeigt, dass YfgC den *surA yfgC* Deletionsstamm nicht so gut komplementiert wie SurA. Das Wachstum ist im Vergleich zum Knockoutstamm jedoch wesentlich besser. *yfgCE137Q* komplementiert dabei ebenso gut wie YfgC mit Proteasefunktion. Dies deutet auf eine mögliche Chaperonfunktion von YfgC hin.

4.1.3.5 LamB-YfgC Interaktion

Die Untersuchung verschiedener Deletionsstämme (Dissertation, J.Weski) lieferte einen Hinweis darauf, dass LamB ein potentielles Substrat von YfgC darstellt. LamB ist ein trimeres Außenmembranprotein, das zur Klasse der Porine gehört und am Maltosetransport beteiligt ist. LamB ist sehr wahrscheinlich ein Substrat von SurA sowie von Skp und DegP (Vertommen *et al.*, 2008). Die Faltung zum Trimer kann in drei Hauptschritte unterteilt werden. Im ersten Schritt erfolgt die Abspaltung der Signalsequenz vom Vorläuferprotein. Im zweiten Schritt wird das ungefaltete, reife LamB (49 kDa) in ein gefaltetes Monomer (30 kDa, apparentes Molekulargewicht in der SDS-PAGE) umgewandelt. Der dritte Schritt führt letztendlich zur Ausbildung des Trimers (80 kDa, apparentes Molekulargewicht in der SDS-PAGE). Diese Faltungsintermediate mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden. Dazu werden die Bakterien vorsichtig lysiert (Gentle Lysis) und die Proben für das Gel nicht aufgeköcht (Ureta *et al.*, 2007). Die Analyse des Gehalts an ungefaltetem, reifem LamB Monomer im *degP yfgC* Stamm wies dabei auf einen Zusammenhang zwischen YfgC und DegP und der Proteolyse von LamB hin. In Abb. 4-12 zeigt der Western Blot (a) bei 80 kDa das LamB Trimer und bei 49 kDa das ungefaltete reife Monomer. Der Wildtyp *BW30270* und der *yfgC* Stamm weisen bei 49 kDa keine Bande auf. Der *degP* Stamm zeigt eine sehr schwache 49 kDa-Bande. Im Gegensatz dazu zeigt der *degP yfgC* Deletionsstamm eine stärkere Bande bei 49 kDa. Dies liefert einen Hinweis darauf, dass DegP und YfgC in der Biogenese von LamB involviert sind.

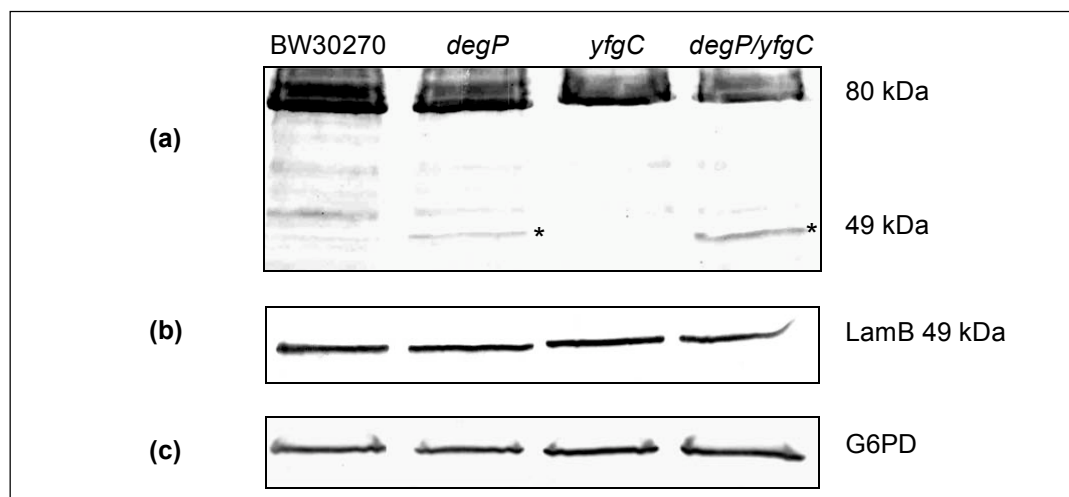


Abb. 4-12: LamB-Faltungsintermediate im *degP yfgC* Stamm: Zur Kontrolle wurde der Wildtyp *BW30270* und die Einzelmутanten mitgeführt. (a) Die Proben wurden 10 min bei 37°C inkubiert. Die Bande bei 80 kDa entspricht dem LamB-Trimer, die Bande bei 49 kDa (mit Stern gekennzeichnet) dem ungefalteten, reifen Monomer (b) Zur Kontrolle des Gesamtanteils von LamB wurden die Proben 5 min bei 95°C inkubiert (c) Als Ladekontrolle wurde Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) detektiert. Angegeben ist der relevante Genotyp.

Zusätzlich zu diesen Ergebnissen wiesen die vorigen Experimente (4.1.3.3 und 4.1.3.4) Zusammenhänge zwischen SurA und YfgC auf. Die Tatsache, dass LamB ebenfalls ein Substrat von SurA darstellt, ist somit ein weiterer Hinweis darauf, dass LamB ein potentielles Substrat von YfgC ist.

4.1.3.6 Co-Immunpräzipitation von LamB

Die Co-Immunpräzipitation sollte Interaktionen zwischen YfgC und potentiellen Substraten bzw. Interaktionspartnern aufklären. In diesem Fall wurde die Wechselwirkung zwischen YfgC mit His-Tag und LamB auf Proteinebene untersucht. Der YfgC-LamB-Komplex wurde mit einem Penta-His-Antikörper präzipitiert, der Nachweis erfolgte mit dem LamB-Antikörper. Für die Co-Immunpräzipitation wurde der *yfgC* Stamm mit dem Leervektor pCS19 (Kontrolle), und den Plasmiden pCL2 (*yfgC*/pCS19) und pYfgCE137Q (*yfgCE137Q*/pCS19) transformiert. Die Kulturen wurden bis zur exponentiellen Phase bei 37°C inkubiert. Die Co-Immunpräzipitation wurde wie unter 3.2.3.15 beschrieben durchgeführt.

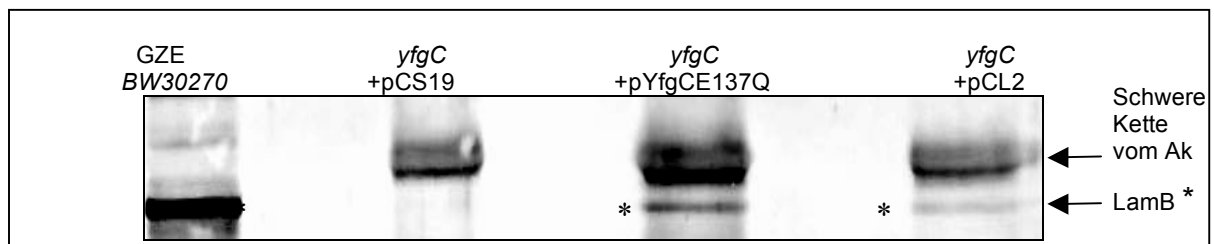


Abb. 4-13: Western Blot der Co-Immunpräzipitation von LamB. Präzipitiert wurde der YfgC-LamB-Komplex mit einem Penta-His-Ak, der Nachweis erfolgte mit LamB-Ak 1:20000. Die LamB-Bande ist mit einem Stern gekennzeichnet. Bei der oberen Bande handelt es sich um die schwere Kette des Antikörpers. GZE (Ganzzellextrakt) aus BW30270 diente als LamB-Positivkontrolle; *yfgC* Stamm + pCS19 ist die Negativkontrolle. Die Induktion erfolgte mit 10 µM IPTG für 3 h bei 37°C.

Die Co-Immunpräzipitation zeigt eine Interaktion zwischen LamB und YfgC. Der Ganzzellextrakt des Wildtypstamms BW30270 weist bei 49 kDa die Kontroll-Bande von LamB (Abb. 4-13 mit Stern gekennzeichnet) auf. Die Negativkontrolle des *yfgC* Stamms mit pCS19 zeigt keine Bande bei dieser Laufhöhe. In den Co-Immunpräzipitationen der *yfgC* Stämme mit der inaktiven Mutante und der aktiven Form von YfgC konnte mit dem LamB-AK eindeutig eine Bande bei 49 kDa nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Hinweise des Abschnitts 4.1.3.5, somit interagieren LamB und YfgC.

4.1.3.7 Nachweis von LptD als potentielles Substrat

LptD ist ein Außenmembranprotein, das maßgeblich in den Aufbau der Lipopolysaccharidschicht involviert ist (Bos *et al.*, 2007b). Zudem ist es sehr wahrscheinlich ein Substrat von SurA (Vertommen *et al.*, 2009). Aufgrund der potentiellen Überschneidung von SurA und YfgC (4.1.3.3 und 4.1.3.4) sowie der Hinweise, dass das SurA-Substrat Lamb auch ein Substrat von YfgC ist (4.1.3.5 und 4.1.3.6), wurde auch LptD als mögliches YfgC-Substrat untersucht. Dazu wurde der LptD-Gehalt im Ganzzelextrakt (3.2.3.1) aus dem Wildtyp BW30270, dem *yfgC*-Deletionsstamm allein, sowie mit dem Leervektor pCS19 und dem Plasmid pCL2 (*yfgC*/pCS19) analysiert. Die Kulturen wurden mit 50 μ M IPTG bei 37°C für 3 h und über Nacht (üN) inkubiert. Die Außenmembranpräparation wurde wie unter 3.2.3.10 beschrieben durchgeführt. Die Proben wurden mittels einer Western Blot Analyse kontrolliert.

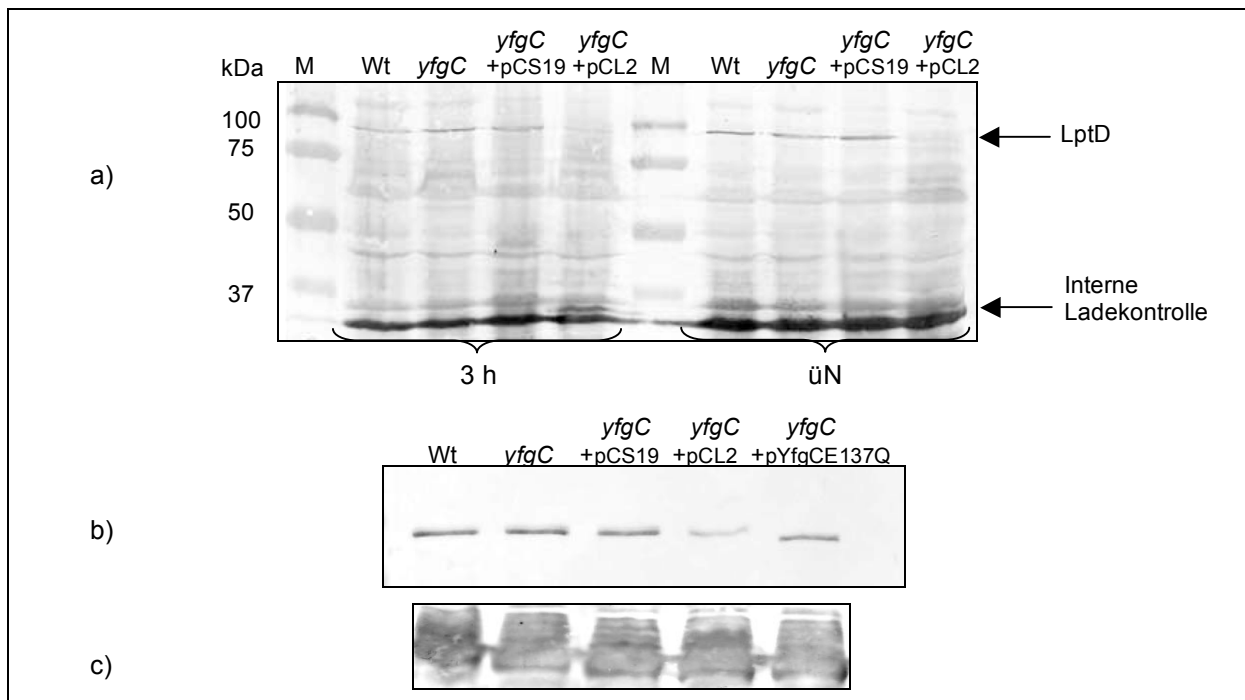


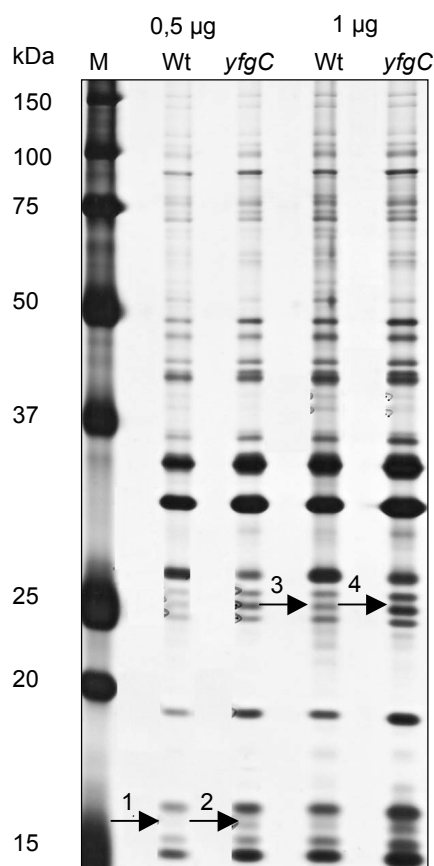
Abb. 4-14: Nachweis von LptD. Der LptD-Gehalt im Wildtyp BW30270 (Wt) wurde verglichen mit dem des *yfgC* Deletionsstamms und den mit Leervektor (pCS19) und YfgC (pCL2) transformierten *yfgC* Deletionsstämmen a) Western Blot des Ganzzelextrakts ($OD_{600}=10$), mit Pfeilen markiert sind die Banden von LptD (ca. 89 kDa) und der internen Ladekontrolle b) Western Blot von LptD in den Außenmembranpräparationen (1 μ g), LptD (Imp)-Ak: 1:7000 c) Ladekontrolle Lpp (ca. 8 kDa) der Außenmembranpräparationen, Lpp-Ak: 1:20000. M: Marker.

Die Western Blot Analyse des Ganzzelextrakts (Abb. 4-14 a) zeigt, dass im komplementierten *yfgC* Deletionsstamm der Gehalt an LptD abnimmt. Zur Kontrolle dieses Hinweises wurde zusätzlich die Außenmembran der entsprechenden Stämme untersucht. Um auszuschließen, dass die Abnahme an LptD nur mit der Überexpression von YfgC und nicht mit dessen proteolytischer Aktivität zusammenhängt, wurde auch die inaktive Form von YfgC (YfgCE137Q) erhöht exprimiert und die Außenmembran präpariert. Als Ladekontrolle

wurde der Lpp-Gehalt bestimmt (Abb. 4-14 c). Die Außenmembranpräparationen weisen auf eine Reduktion des LptD-Gehalts im, mit aktiven YfgC, komplementierten *yfgC* Stamm hin (Abb. 4-14 b). Der Stamm mit der inaktiven YfgC-Variante zeigt keine Abnahme, jedoch läuft in diesem Stamm die LptD-Bande etwas niedriger als in den anderen Stämmen, was entweder auf einen Abbau oder eine andere Konformation zurückzuführen ist. LptD stellt folglich in Gegenwart einer erhöhten Menge von aktiven YfgC ein potentielles Substrat dar.

4.1.3.8 Substratidentifizierung in der Außenmembranfraktion

Zur weiteren Substratsuche wurden von dem *yfgC* Deletionsstamm und dem Wildtypstamm Außenmembranpräparationen (3.2.3.10) hergestellt. Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung und Silberfärbung wurden die, im Wildtyp und Knockoutstamm, zueinander unteschiedlichsten Banden ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und massenspektrometrisch analysiert (die massenspektrometrische Analyse erfolgte in Kooperation mit Dr. Urs Lewandowski am ISAS Dortmund). Die Kulturen wurden unter den Bedingungen angezogen, bei denen der *surA yfgC* Deletionsstamm synthetisch letal ist (500 mM NaCl, 42°C; Weski, unveröffentlicht). Auf diesem Wege können potentielle Substrate, welche YfgC unter diesen Stressbedingungen umsetzt, ermittelt werden.



Bande 1	Bande 2
YedD (15 kDa)	Pal (18,8 kDa)
YhhA (16,6 kDa)	
Pal (18,8 kDa)	
Bande 3	Bande 4
OmpA (37 kDa) Abbaubande	OmpA (37 kDa) Abbaubande
VacJ (28 kDa)	VacJ (28 kDa)
YcfM (22,5 kDa)	YcfM (22,5 kDa)
YggG (26 kDa)	

Tab. 4-3: Ergebnisse der Außenmembrananalyse.
Die Nummern der Banden entsprechen denen des Silbergels

Abb. 4-15: Silbergel der Außenmembrananalyse. Die Außenmembranpräparationen des Wildtypstamms BW30270 (Wt) und des *yfgC* Deletionsstamms (*yfgC*) wurden bei 37°C und 42°C + 500 mM NaCl hergestellt. Mit Pfeilen und Nummern gekennzeichnet sind die Banden die massenspektrometrisch analysiert wurden. Aufgetragen wurden 0,5 µg und 1 µg Proteingesamtmenge wie oberhalb beschrieben.

Die Abb. 4-15 zeigt die Banden der Außenmembranpräparationen, die massenspektrometrisch analysiert wurden. In Tab. 4-3 sind die Ergebnisse der Massenspektrometrie aufgelistet. Pal ist sowohl im Wildtypstamm als auch im *yfgC* Deletionsstamm vorhanden und damit kein relevanter Treffer. YhhA ist ein uncharakterisiertes Protein mit Signalsequenz und damit könnte es ein potentielles Substrat von YfgC sein. Die Daten weisen auf eine Tendenz von YfgC zu Lipoproteinen hin. Bei den Proteinen YedD und **YggG** handelt es sich um Lipoproteine, die nach der Signalsequenz zu urteilen, in der Außenmembran verankert werden. Interessant ist der Treffer YggG, da diese Metalloprotease ebenfalls in dieser Arbeit charakterisiert werden soll und nach diesen Daten möglicherweise ein potentielles Substrat oder Interaktionspartner von YfgC ist. Um dieses Ergebnis weiter zu verifizieren wurde 1 µg der Außenmembranpräparationen mittels Immunoblotanalyse auf den YggG-Gehalt untersucht.

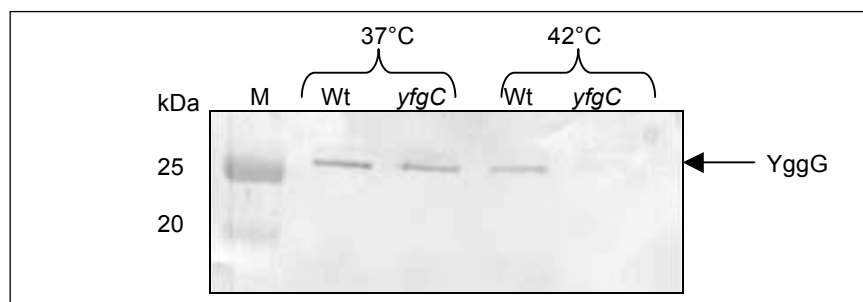


Abb. 4-16: Western Blot zur YggG Detektion. Der YggG-Gehalt wurde in den Außenmembranpräparationen des Wildtypstamms BW30270 (Wt) und des *yfgC* Deletionsstamms (*yfgC*) bei 37°C und 42°C + 500 mM NaCl nachgewiesen. Der YggG-Antikörper wurde 1:20000 eingesetzt. M: Marker

Der Nachweis von YggG in der Außenmembran mittels Immundetektion (Abb. 4-16) zeigt, dass YggG bei 42°C und 500 mM NaCl im *yfgC* Deletionstamm fehlt. Dies bestätigt das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse. Unter den Wachstumsbedingungen bei 42°C und 500 mM NaCl liegt somit sehr wahrscheinlich eine Interaktion zwischen YfgC und YggG vor.

4.1.3.9 Kontrolle der LolA-Konzentration

LolA ist Teil des Lipoprotein-Transportwegs und die periplasmatische Komponente, die Lipoproteine, welche kein Aspartat an zweiter Position nach dem Cystein aufweisen, zur Außenmembran transportiert. Die LolA-Menge unter den genannten Bedingungen untersucht werden, um auszuschließen, dass YggG aufgrund einer niedrigeren LolA-Konzentration nicht mehr in die Außenmembran gelangt. Dafür wurden Kulturen von BW30270 und dem *yfgC* Stamm bei 42°C und 500 mM NaCl angezogen, genau wie für die Außenmembranpräparation (4.1.3.7). Der Ganzzellextrakt der Kulturen wurde anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Western Blot Analyse unterzogen.

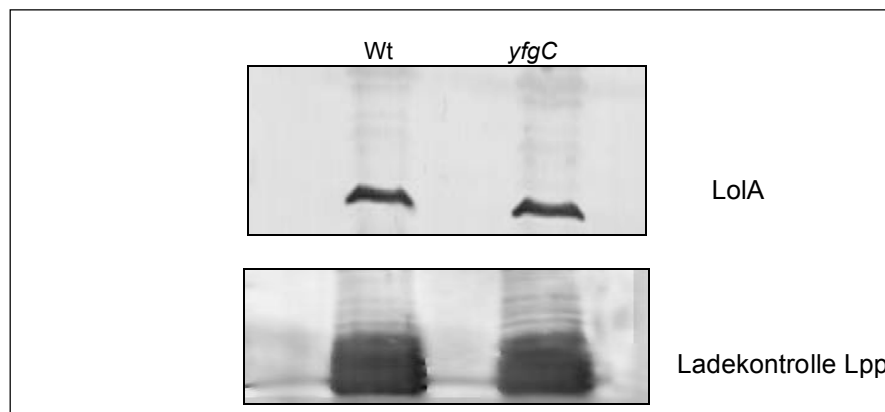


Abb. 4-17: Western Blot zur LolA Detektion. Der LolA-Gehalt (ca. 22 kDa) wurde in den Ganzzellextrakten des Wildtypstamms BW30270 (Wt) und des *yfgC* Deletionsstamms (*yfgC*) bei 42°C + 500 mM NaCl ermittelt. Aufgetragen wurde Ganzzellextrakt OD₆₀₀=10. Der LolA-Ak wurde 1:20000 eingesetzt. Ladekontrolle ist Lpp (ca. 8 kDa) Lpp-Ak 1:20000. M: Marker

Der LolA Nachweis (Abb. 4-17) zeigt, dass der Gehalt sowohl im Wildtypstamm BW30270 als auch im *yfgC* Stamm unter den getesteten Wachstumsbedingungen gleich ist. Der Kontroll-Western Blot weist zwei gleich starke Lpp-Banden auf, womit sicher gestellt ist, dass die aufgetragenen Proteinkonzentrationen identisch sind. Dieses Ergebnis belegt, dass kein Zusammenhang zwischen dem verminderten YggG-Gehalt und LolA besteht.

4.1.4 Crosslink von YggG und YfgC

Zum Nachweis einer potentiellen Interaktion zwischen YfgC und YggG wurde chemisches 'Crosslinking' durchgeführt. Dazu wurden 5 μ M gereinigtes YfgC mit 5 μ M gereinigtem YggG in 100 μ l Phosphatpuffer mit Glutaraldehyd (GA) versetzt und für 5 min bei 37°C inkubiert. Die weitere Durchführung erfolgte wie unter 3.2.3.14 beschrieben. Als Kontrollen dienten 5 μ M YggG und 5 μ M YfgC. Die Reaktionsansätze wurden ohne DTT-Zugabe oder Aufkochen über Bis-Tris-Gele getrennt und mit Silbernitrat gefärbt.

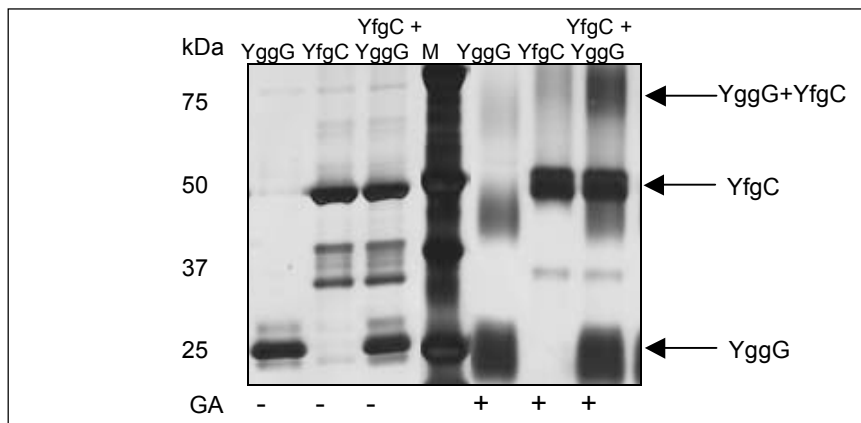


Abb. 4-18: Silbergel des YfgC-YggG Crosslinks. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind die Monomere von YggG (25 kDa) und YfgC (50 kDa) und der interagierende Komplex von YggG und YfgC. Als Kontrolle wurden YggG und YfgC allein aufgetragen aufgetragen. Glutaraldehyd (GA) '-' (ohne) und '+' (mit). M: Marker

Das Silbergel zeigt in dem Reaktionsansatz YfgC+YggG+GA eine Bande bei 75 kDa (Abb. 4-18). Diese ist in den Kontrollen YggG bzw. YfgC nicht zu erkennen. Dies deutet auf eine Interaktion zwischen YfgC und YggG *in vitro* hin. Um nachzuweisen, dass es sich tatsächlich um eine Wechselwirkung beider Proteine handelt, wurde YfgC mittels Immunblot-Analyse detektiert (Abb. 4-19).

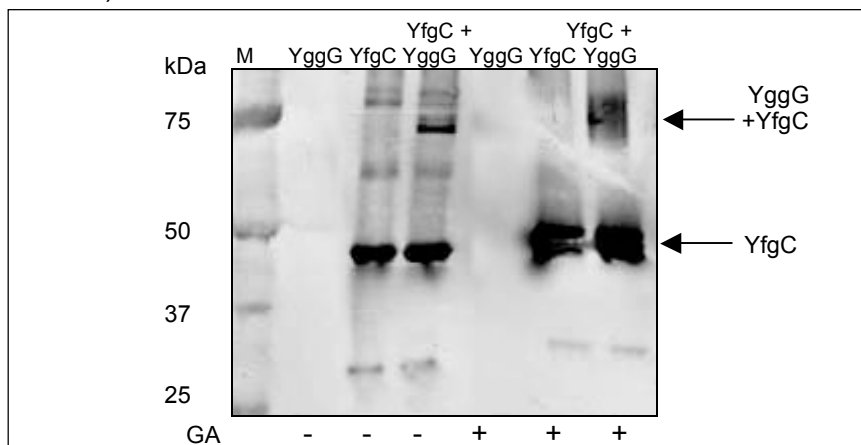


Abb. 4-19: Western Blot zur Detektion von YfgC. Der Western Blot des chemischen 'Crosslinking' dient zum Nachweis der Interaktion von YggG mit YfgC. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind das Monomer YfgC (50 kDa) und der interagierende Komplex von YggG und YfgC (75 kDa). Als Kontrolle wurden YggG und YfgC allein aufgetragen aufgetragen, hier zeigt sich bei 75 kDa keine Bande. Glutaraldehyd (GA) '-' (ohne) und '+' (mit). Der Nachweis erfolgte mit YfgC-Antikörper 1:20000. M: Marker.

Der Western Blot (Abb. 4-19) weist, ebenso wie das Silbergel, eine Bande bei 75 kDa auf. In den beiden YfgC- und YggG-Kontrollen ist diese Bande nicht vorhanden, was eine Interaktion von YfgC und YggG sowie die bisherigen Ergebnisse (4.1.3.7) belegt.

4.1.5 Co-Immunpräzipitation YggG-YfgC

Zum Nachweis einer Interaktion von YfgC und YggG wurde eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Der YfgC-YggG(His-Tag)-Komplex wurde einem Penta-His-Antikörper präzipitiert, der Nachweis erfolgte mit dem YfgC-Antikörper. Dazu wurde der *yggG* Stamm mit dem Leervektor pCS19 (Kontrolle), den Plasmiden pCL4 (*yggG*/pCS19) und pYggGE131Q (*yggGE131Q*/pCS19) transformiert. Die Kulturen wurden bis zur exponentiellen Phase bei 37°C inkubiert. Die Co-Immunpräzipitation wurde wie unter 3.2.3.15 beschrieben durchgeführt.

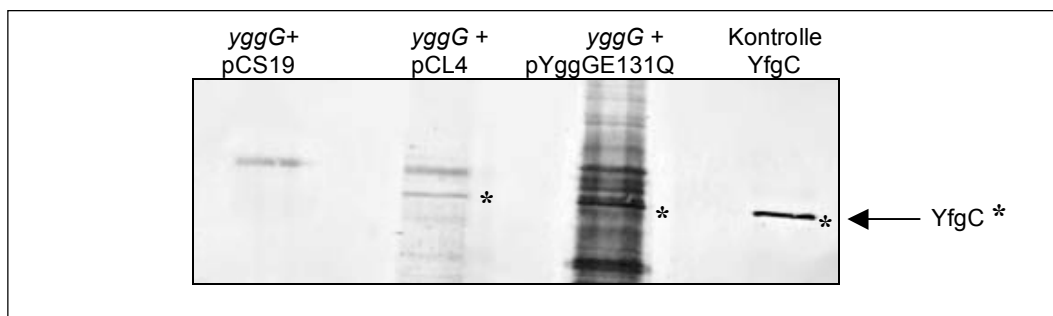


Abb. 4-20: Co-Immunpräzipitation von YfgC: Präzipitiert wurde der YggG-YfgC-Komplex mit einem Penta-His-Ak, der Nachweis erfolgte mit YfgC-Ak 1:20000. Die YfgC-Bande ist mit einem Stern gekennzeichnet. Bei der oberen Bande handelt es sich um die schwere Kette des Antikörpers. Positivkontrolle diente gereinigtes YfgC (50 kDa); *yggG* Stamm + pCS19 ist die Negativkontrolle. Die Induktion erfolgte mit 10 µM IPTG für 3 h bei 37°C

In Abb. 4-20 sind die YfgC-Banden mit einem Stern gekennzeichnet. Die Co-Immunpräzipitation zeigt eine Interaktion zwischen YfgC und YggG. Das gereinigte YfgC diente als Positivkontrolle und weist bei 50 kDa die Kontroll-Bande auf. Die Negativkontrolle des *yggG* Stamms mit pCS19 zeigt keine Bande bei dieser Laufhöhe. In den Co-Immunpräzipitationen der *yggG* Stämme mit der inaktiven Mutante *yggGE131Q* und der aktiven Form von YggG konnte mit dem YfgC-Antikörper eindeutig eine Bande bei 50 kDa nachgewiesen werden. Durch diese Ergebnisse werden die Hinweise aus den Punkten 4.1.3.7 und 4.1.4 bestätigt. Daraus lässt sich schließen, dass YfgC und YggG miteinander interagieren.

4.2 Die Metalloprotease YggG

4.2.1 Reinigung von YggG

Für die Reinigung wurde YggG mit His-Tag in *E. coli* DH5 α -Zellen überproduziert (3.2.3.12). Nach Zellaufschluss erfolgte die Reinigung von YggG mittels Affinitätschromatographie über Ni-TED-Säulen (3.2.3.12). Die gesamte Reinigung wurde bei 4°C durchgeführt. Um den Erfolg der Reinigung zu kontrollieren wurden nach allen Reinigungsschritten 10 μ l Probe entnommen und mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert. In Abb. 4-21 ist der Verlauf der YggG-Reinigung dargestellt.

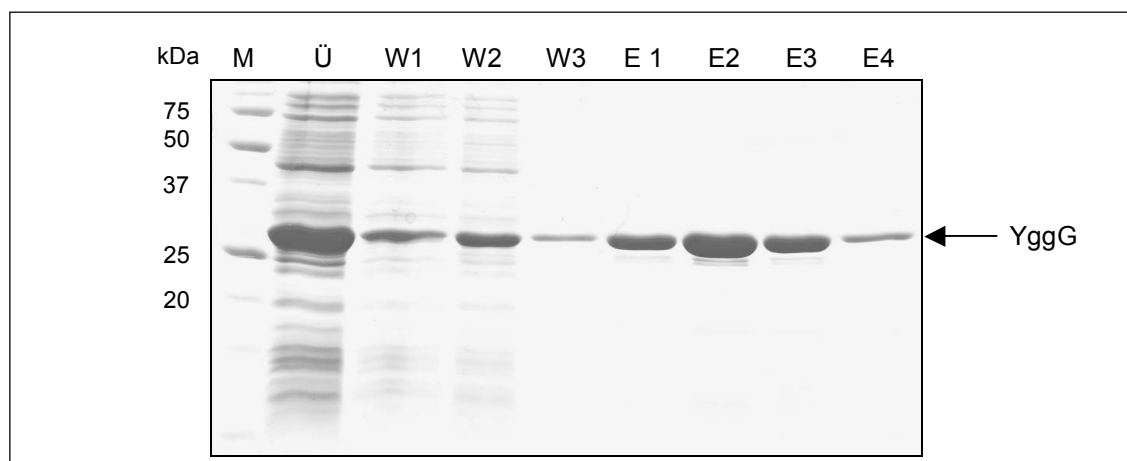


Abb. 4-21: Reinigung von YggG. Die Auftrennung der Proben erfolgte über ein 15%iges SDS-Gel. Das Coomassiegel zeigt die Proben, die nach jedem Reinigungsschritt entnommen wurden (Ü: Überstand vor Auftrag auf die Ni-TED-Säule, W1: Waschschrift mit LEW-Puffer + 3 mM Imidazol; W2: LEW-Puffer + 1 M NaCl; W3: LEW-Puffer; E1-4: LEW-Puffer + 150 mM Imidazol). M: Marker

Abb. 4-21 zeigt eine erfolgreiche Induktion der YggG-Expression im Überstand des Lysats. Die Waschschrte 1 und 2 (W1 und W2) zeigen die Entfernung von Verunreinigungen mit dem einhergehenden Verlust von geringen Mengen YggG. Im Waschschrift 3 (W3) eluiert nur noch YggG von der Säule, wobei der Gehalt jedoch gering ist. Die anschließenden Elutionsschritte zeigen nur noch gereinigtes YggG. Die höchste Konzentration zeigte sich dabei in Elutionsfraktion 2. Nach Aufkonzentrierung und Dialyse der Fraktionen wurde eine Proteinmenge von 14 mg mittels Bradford bestimmt.

4.2.2 *In vitro* Charakterisierung

4.2.2.1 Oligomerisierung von YggG

Lipoproteine können, wie andere Proteine auch, verschiedene Oligomerisierungszustände annehmen. So weist das in der Cytoplasmamembran lokalisierte Lipoprotein Nlpl einen dimeren Oligomerisierungszustand auf (Wilson *et al.*, 2005). Die Struktur und der Oligomerisierungszustand von YggG sind bisher noch unerforscht. Mit Hilfe der Gelfiltration sollte aus diesem Grund der oligomere Zustand von YggG *in vitro* ermittelt werden.

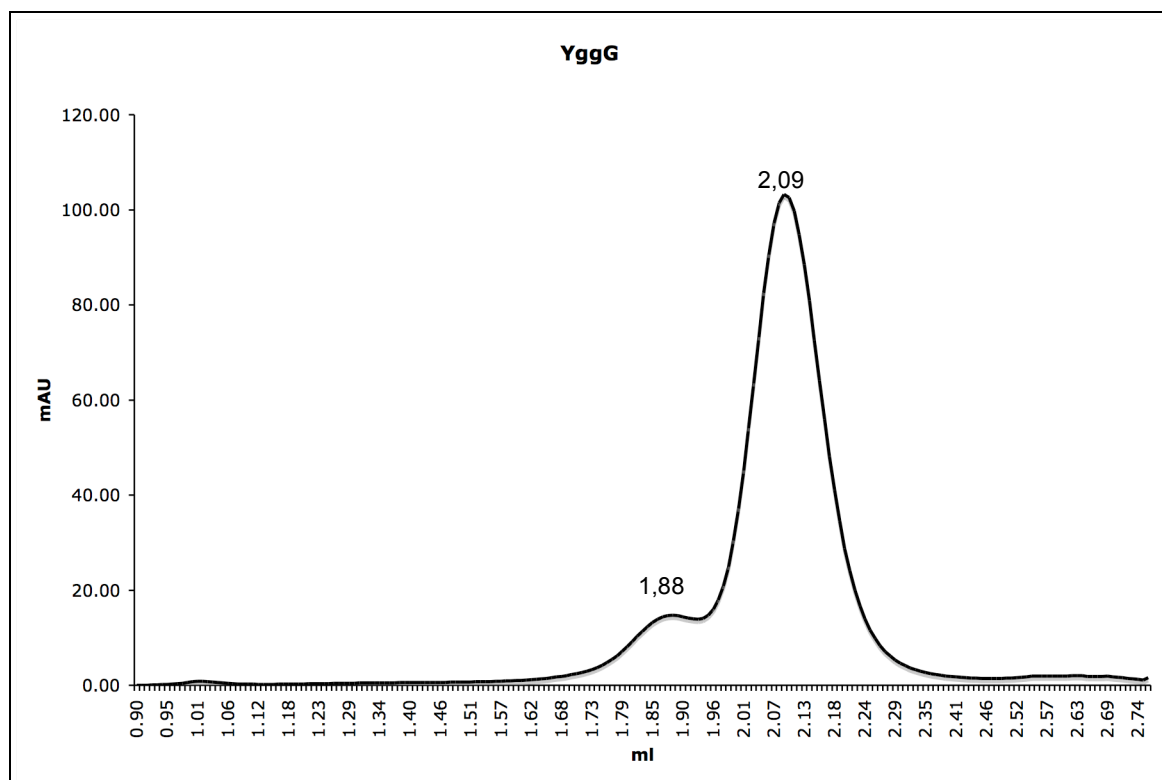


Abb. 4-22: Gelfiltration von gereinigtem YggG. Die Abbildung zeigt den Lauf der Gelfiltration von YggG über die Säule Superdex 200 5/150 GL, die Elutionsvolumina sind der oberhalb der 'Peaks' vermerkt. Die Y-Achse gibt die mAU 'milli absorbance units' und die X-Achse das Elutionsvolumen in ml an.

Die Gelfiltration (Abb. 4-22) zeigt, dass YggG in kleineren Mengen mit einem Volumen von 1,88 ml von der Säule eluiert. Nach Berechnungen unter Einbeziehung der Kalibrierungsgeraden entspricht das einem Molekulargewicht von 62,7 kDa. Das gereinigte YggG besitzt eine Größe von ca. 25 kDa, daraus ergibt sich, dass YggG zum Teil als Dimer vorliegt. Der Hauptanteil von YggG eluiert mit einem Volumen von 2,09 ml von der Säule. Nach den Berechnungen ergibt sich daraus eine Größe von 29,25 kDa, welche dem Monomer entspricht. Somit liegt YggG *in vitro*, in Abwesenheit eines Substrats, hauptsächlich als Monomer und in geringeren Anteilen als Dimer vor.

4.2.2.2 Crosslink von YggG

Um das Ergebnis der Gelfiltration und das Verhältnis von Monomer zu Dimer zu bestätigen, wurde YggG in chemischen `Crosslink`-Reaktionen untersucht. Dazu wurden 5 μ M gereinigtes YggG in 100 μ l Phosphatpuffer mit Glutaraldehyd (GA) versetzt und für 2, 5 und 30 min bei 37°C inkubiert. Die weitere Durchführung erfolgte wie unter 3.2.3.14 beschrieben. Als Kontrolle diente 5 μ M YggG ohne GA. Die Proben wurden ohne DTT-Zugabe oder aufkochen über Bis-Tris-Gele getrennt und mit Silbernitrat gefärbt.

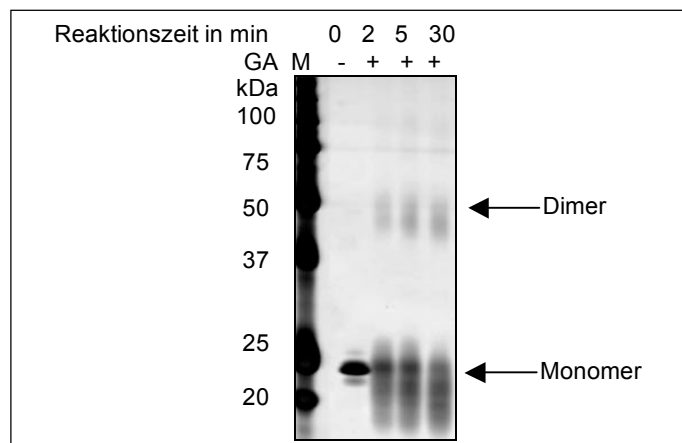


Abb. 4-23: Silbergel des YggG-Crosslinks. Das Silbergel zeigt die Proben des chemischen `Crosslinking` (3.2.3.14) von YggG nach verschiedenen Zeitpunkten. Aufgetragen wurden 0,5 μ g Protein. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind das Monomer (25 kDa) und Dimer (50 kDa). Als Kontrolle wurde ohne Glutaraldehyd aufgetragen. M: Marker

Das Silbergel des YggG-`Crosslinks` zeigt eine starke Bande bei ca. 25 kDa und eine schwächere Bande bei 50 kDa (Abb. 4-23). YggG liegt überwiegend als Monomer vor, wobei ein geringerer Teil in den dimeren Zustand oligomerisiert. Die Ergebnisse der Gelfiltration von YggG werden damit bestätigt, *in vitro* liegt YggG in zwei unterschiedlichen Oligomerisierungszuständen vor, wobei der monomere Zustand dominiert.

4.2.3 Substratsuche und -analyse *in vitro*

Zur Untersuchung der potentiellen Proteaseaktivität von YggG wurde eine Reihe von universellen und spezifischeren Protease-Substraten getestet. Zu den universellen Substraten, die durch YggG nicht proteolysiert wurden, gehören Malat-Dehydrogenase und Citratsynthase. Als spezifischeres Substrat wurde denaturiertes OmpC eingesetzt, da es sich wie YggG in der Außenmembran befindet und somit ein potentielles Substrat darstellen könnte. Des Weiteren wurde, wie für die Metalloprotease YfgC auch, die oxidierte Insulin β -Untereinheit (4.1.2.2), die FRET-Peptidbibliotheken, sowie eine Reihe von pNA-Substraten (Tab. 4-1) getestet. Diese Substrate zeigten ebenfalls keinen Abbau durch YggG. Zusätzlich erfolgte eine Aktivitätsanalyse *via* Zymogramm, dabei war in dem Gelatine-Zymogramm kein Umsatz durch YggG zu erkennen.

4.2.3.1 Casein-Zymogramm

Bei der Substratsuche wurde auch ein Casein-Zymogramm durchgeführt. Die Durchführung des Zymogramms erfolgte wie unter 3.2.3.16 beschrieben. Beladen wurde das Gel mit 10 µg YggG, sowie 5 µg DegP (Reinigung, Meltzer) zur Kontrolle.

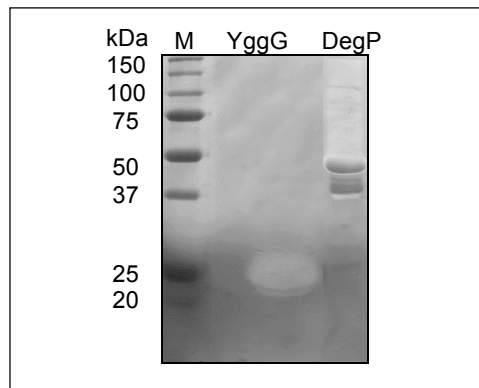


Abb. 4-24: Casein-Zymogramm. Das Casein-Zymogramm (3.2.3.16) von YggG (25 kDa) und DegP (50 kDa) (Positivkontrolle) weist helle Höfe in Läuflhöhe der Proteine auf, diese stellen den Caseinabbau dar. M: Marker

Das Casein-Zymogramm (Abb. 4-24) zeigt einen Abbau des Caseins im Bereich von YggG (25 kDa). Als Kontrolle wurde DegP (ca. 50 kDa) aufgetragen, auch hier ist ein Abbau des Caseins zu erkennen. Somit stellt das Caseingemisch offensichtlich ein Substrat für YggG dar.

4.2.3.2 Gesamtcaseinverdau

Zur Verifizierung des Ergebnisses aus dem Casein-Zymogramm wurde eine Proteolyse von Casein durch YggG in Lösung durchgeführt. Dazu wurden 20 µg Casein mit 10 µg YggG in 100 µl Ansätzen für 1 h, 3 h und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

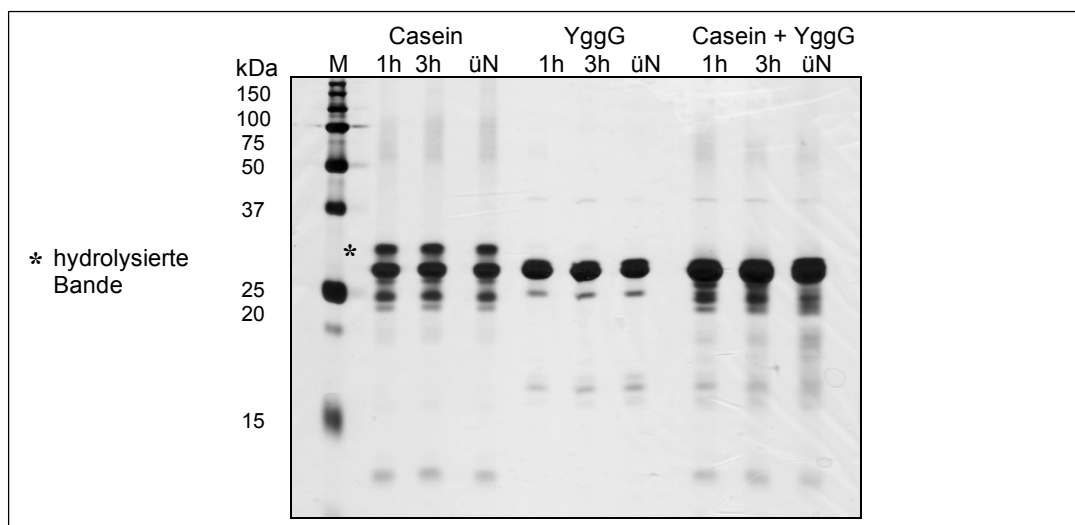


Abb. 4-25: Silbergel der Caseinproteolyse. Abgebildet ist der Caseinverdau durch YggG nach 1 h, 3 h und über Nacht (ÜN). Als Kontrollen wurden Casein und YggG allein mitgeführt. In der Caseinkontrolle ist die Bande, die proteolytisch wird, mit einem Stern markiert. Reaktionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl pH 7.5; M: Marker

Die Proteolyse des Caseins, die im Zymogramm zu erkennen ist, beschränkt sich auf einen Teil des Caseingemisches. Der Vergleich der Kontrolle des Caseins und des Proteolyseansatzes zeigt, dass YggG nur die obere Bande (in Abb. 4-25 mit Stern gekennzeichnet) des Caseingemisches hydrolysiert. Da Casein aus α -, β -, κ -Casein besteht, ist es notwendig zu analysieren um welche Caseinvariante es sich hierbei handelt.

4.2.3.3 β -Caseinverdau

Zur Ermittlung der durch YggG abgebauten Caseingruppe, erfolgte eine Testreihe aus Proteolyseansätzen mit den unterschiedlichen Caseinformen. Zuerst wurde β -Casein eingesetzt, dieses ist ein oft verwandtes Substrat, welches z.B. durch Proteasen wie DegP, HtpX (Sakoh *et al.*, 2005) und Tsp (Weski, unveröffentlicht) abgebaut wird. In dem Proteolyseansatz wurden 20 μ g β -Casein und 10 μ g YggG eingesetzt und bei 37°C für 6 h inkubiert. Analysiert wurden die Proben durch SDS-PAGE und anschließende Coomassiefärbung.

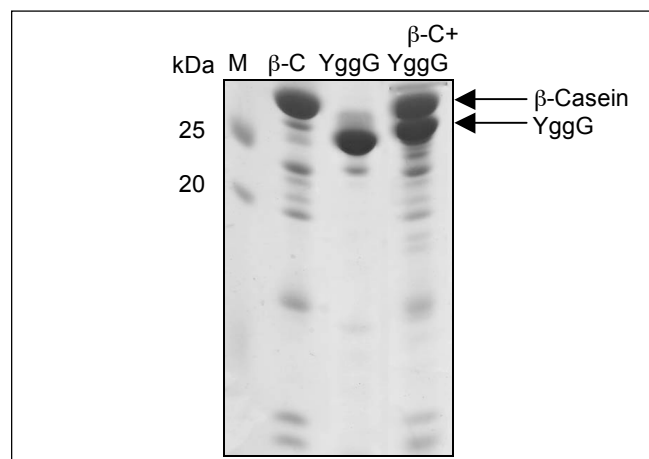


Abb. 4-25: Proteolyseansatz von β -Casein. SDS-PAGE Analyse des Proteolyseansatzes von β -Casein mit YggG nach 6 h. Als Kontrollen wurden β -Casein (β -C) und YggG allein mitgeführt. Reaktionspuffer: 50 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, pH 7,5; M: Marker

Wie auf dem Gel (Abb. 4-25) zu erkennen ist, wird β -Casein nicht durch YggG hydrolysiert. So ist zwischen den Bandenmustern der β -Caseinkontrolle und des Proteolyseansatzes kein Unterschied sichtbar. Somit kann es sich bei der abgebauten Bande im Gesamtcaseinverdau nicht um β -Casein handeln.

4.2.3.4 α -Caseinverdau

Da sich β -Casein nicht als das gesuchte Substrat herausstellte, wurde α -Casein getestet. Dieses liegt in zwei Varianten als α S1- und α S2-Casein vor und wurde als Mischung beider eingesetzt. 50 μ g α -Casein wurden mit 10 μ g YggG für 6 h bei 37°C inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert.

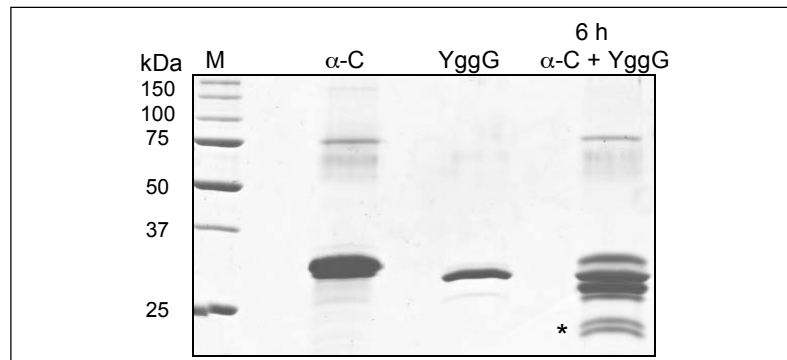


Abb. 4-26: α -Caseinabbau. SDS-PAGE Analyse des Proteolyseansatzes von α -Casein mit YggG nach 6 h. Als Kontrollen wurden α -Casein (α -C) und YggG allein mitgeführt. Mit einem Stern markiert sind die Proteolysebanden. Reaktionspuffer: 50 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, pH 7,5; M: Marker

Abb. 4-26 zeigt eine Proteolyse des α -Caseins durch YggG. Im Vergleich zur α -Caseinkontrolle sind in dem Proteolyseansatz Abbaubanden oberhalb und unterhalb von 25 kDa zu erkennen. Hierdurch wird eindeutig bewiesen, dass es sich bei der hydrolysierten Bande im Gesamtcaseinverdau sowie im Zymogramm um α -Casein handelt. Der Abbau des α -Casein durch YggG wurde sowohl im Tris- als auch im NaH_2PO_4 -Puffer getestet. Unabhängig vom Puffer war das Muster der Abbaubanden immer identisch.

4.2.3.5 Oligomerisierungsanalyse von α -Casein + YggG

Zur Untersuchung des oligomeren Zustandes von YggG in Gegenwart von α -Casein wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Dafür wurden 200 μ g α -Casein mit 100 μ g YggG 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend über die Gelfiltrationssäule Superdex 200 5/150 GL aufgetrennt. Als Kontrolle wurde zusätzlich ein Lauf nur mit α -Casein bzw. YggG (Abb. 4-22) unter denselben Bedingungen durchgeführt. Die Elutionsfraktionen des Laufs von α -Casein mit YggG wurden mittels SDS-PAGE und anschließende Coomassiefärbung sowie Western Blot Analyse kontrolliert.

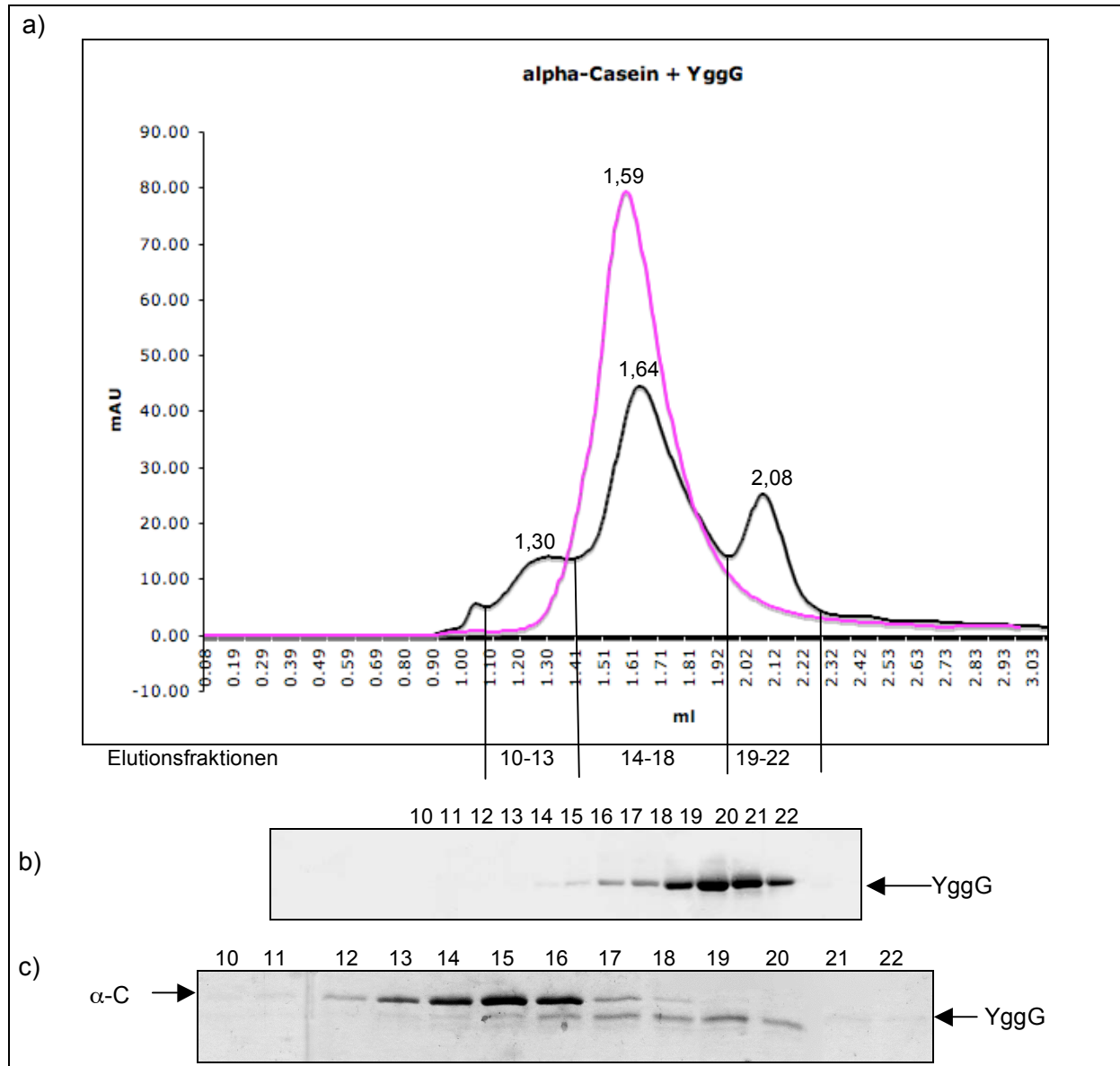


Abb. 4-27: Gelfiltration von α -Casein + YggG. a) Der Gelfiltrationslauf von α -Casein ist in pink und der Lauf von α -Casein und YggG in schwarz abgebildet b) Western Blot der Gelfiltration von α -Casein + YggG: Die Nummerierung entspricht den Elutionsfraktionen; Nachweis mit YggG-Ak 1:20000 c) Coomassiegelel der Gelfiltration von α -Casein + YggG, aufgetragen wurden 15 μ l Probe, die Nummerierung entspricht den Elutionsfraktionen. Die Y-Achse gibt die mAU 'milli absorbance units' und die X-Achse das Elutionsvolumen in ml an.

Die Gelfiltration zeigt, dass α -Casein (Abb. 4-27, Kurve in pink) mit einem Volumen von 1,59 ml von der Säule eluiert. Nach Berechnungen anhand der Kalibrierungsgeraden entspricht dieses Elutionsvolumen einem Molekulargewicht von 182 kDa. α -Casein besitzt eine Größe von ca. 25 kDa, somit liegt es unter den getesteten Bedingungen *in vitro* als Heptamer vor. Der Lauf von α -Casein mit YggG zeigt drei 'Peaks'. Bei dem ersten mit einem Elutionsvolumen von 1,30 ml handelt es sich um α -Casein, wie das Coomassiegelel (Abb. 4-27 c) erkennen lässt. Aus diesem Volumen ergibt sich eine Größe von 525 kDa, womit α -Casein als 21-mer vorliegt. Die Fraktionen des zweiten 'Peaks' (Abb. 4-27 c) zeigen, dass in diesem Bereich ebenfalls nur α -Casein eluiert. Das Volumen von 1,64 ml entspricht einer

Größe von 151 kDa. Dies deutet daraufhin, dass α -Casein als Hexamer vorliegt und ungefähr mit dem oligomeren Zustand des Kontrolllaufs übereinstimmt. YggG eluiert im dritten 'Peak' mit einem Volumen von 2,08 ml. Das entspricht 30,3 kDa und somit ca. der Größe des YggG-Monomers, die schon in der vorigen Gelfiltration von YggG (Abb. 4-22) zu erkennen ist. Der Western Blot (Abb. 4-27 b) zeigt die stärksten Banden in den Fraktionen 19 und 20, das Coomassiegel weist in diesem Bereich nur YggG und kein α -Casein auf. In den Fraktionen 14-18, in denen vor allem das Substrat eluiert, sind nur geringere Mengen an YggG zu erkennen. Da der Hauptteil des YggG im monomeren Bereich eluiert, weist dies daraufhin, dass es in Gegenwart eines Substrats den gleichen Oligomerisierungszustand besitzt, wie in einem Lauf ohne Substratzusatz (4.2.2.1; Abb. 4-22). Somit zeigt die aktive Form von YggG keine relevanten oligomeren Veränderungen. α -Casein bildet hingegen in Gegenwart von YggG hohe Oligomerisierungszustände aus, die ohne diese Protease nicht nachzuweisen sind.

4.2.3.6 Massenspektrometrische Analyse des α -Caseinhydrolysats

Zur Ermittlung der Schnittstellen von YggG wurden α -Casein und dephosphoryliertes α -Casein durch YggG hydrolysiert. Dafür wurden 50 μ g Casein mit 5 μ g YggG in 100 μ l Phosphatpuffer bei 37°C für 2 h und über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurde eine Acetonfällung (3.2.3.2) durchgeführt und der Überstand sowie das Pellet massenspektrometrisch analysiert. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Urs Lewandrowski, ISAS Dortmund. Die Kontrolle der Proteolyse erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung.

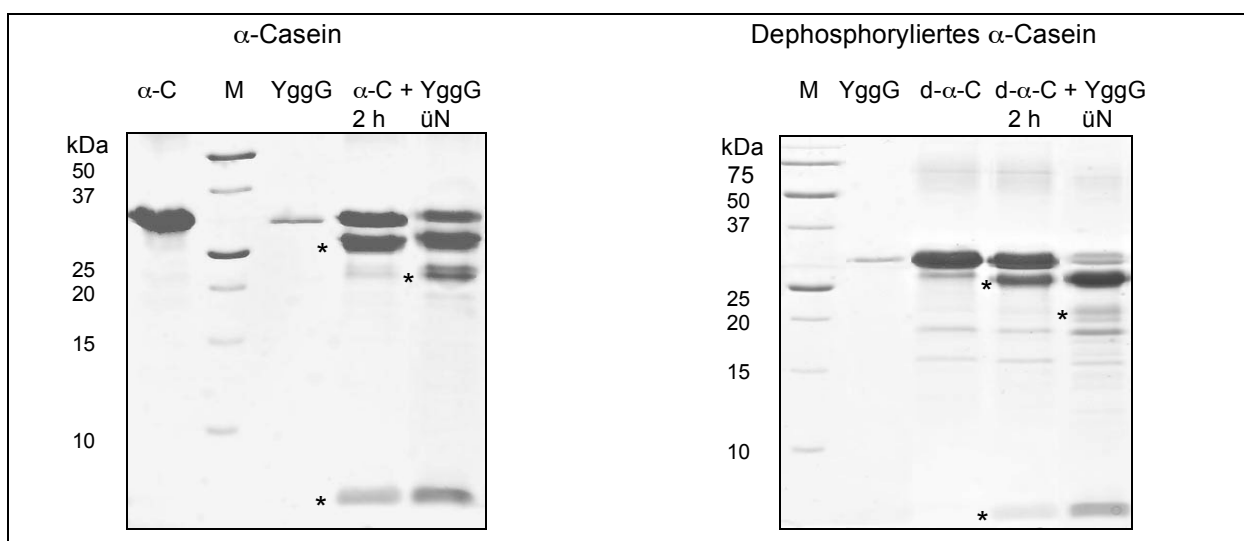


Abb. 4-28: α -Caseinhydrolysate für die MS. Die Coomassiegele zeigen die Proteolyse von α -Casein (α -C, links) und dephosphoryliertem α -Casein (d- α -C, rechts) durch YggG nach 2 h und über Nacht (∞ N). Als Kontrollen wurden α -Casein und YggG alleine mitgeführt. Mit Sternen markiert sind die Proteolysebanden. Reaktionspuffer: 50 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, pH 7,5; M: Marker

Der Verdau zeigt (Abb. 4-28), dass beide Formen des α -Caseins nicht vollständig von YggG hydrolysiert werden. Es entstehen Fragmente unterhalb der 10 kDa Bande, die nach 2 h im Proteolyseansatz des phosphorylierten α -Caseins stärker ausgeprägt sind als im Ansatz mit dephosphoryliertem α -Casein. Unterhalb der 25 kDa Bande entstehen zwei definierte Fragmente, deren Mengen über die Zeit zunehmen. Oberhalb der 25 kDa entsteht eine stark ausgeprägte Bande, die anscheinend nicht weiter abgebaut wird. Des Weiteren lässt sich ein Unterschied in den Abbaubanden des phosphorylierten und dephosphorylierten α -Casein erkennen. Unterhalb der 15 kDa Bande entstehen bei dem dephosphorylierten α -Casein mehrere schwache Banden, welche im anderen Ansatz nicht zu sehen sind. Auffällig ist auch, dass die Banden unterhalb von 25 kDa nicht so stark ausgeprägt sind.

Alpha-S1-casein, Bos taurus (Bovine) prozessiert durch YggG

```

      10      20      30      40      50      60
MKLLILTCLV AVALARPKHP IKHGLPQEV | LLENLLRFFV | APFPEVFGKE | KVNELSKDIG
      70      80      90      100     110     120
SESTEDQAME DIKQMEAESI SSSEEIVPNS VEQKHIOKED VPSERYLGYL EQLRLKKYK
      130     140     150     160     170     180
VPQLEIVPNS AEERLHSMKE GIHAQQKEPM IGVNQLAYF YPELFRQFYQ LDAYPSGAWY
      190     200     210
YVPLGTQYTD APSFSDIPNP IGSENSEKTT MPLW

```

Alpha-S1-casein dephosphoryliert, Bos taurus (Bovine)

```

      10      20      30      40      50      60
MKLLILTCLV AVALARPKHP IKHGLPQEV | LLENLLRFFV | APFPEVFGKE | KVNELSKDIG
      70      80      90      100     110     120
SESTEDQAME DIKQMEAESI SSSSEEIVPNS VEQKHIOKED VPSERYLGYL EQLRLKKYK
      130     140     150     160     170     180
VPQLEIVPNS AEERLHSMKE GIHAQQKEPM IGVNQLAYF YPELFRQFYQ LDAYPSGAWY
      190     200     210
YVPLGTQYTD APSFSDIPNP IGSENSEKTT MPLW

```

Abb. 4-29: Schnittmuster von YggG in α -Casein und dephosphoryliertem α -Casein. Dargestellt sind die potentiellen Schnittstellen im α -Casein, die massenspektrometrisch ermittelt wurden. Dephosphorylierte AS sind gelb markiert. Rot umrandet ist die wahrscheinlichste Schnittstelle F/F, da sie die größte Abundanz aufwies.

Die Schnittmuster (Abb. 4-29) zeigen, dass dephosphoryliertes α -Casein an anderen Stellen hydrolysiert wird, als phosphoryliertes Casein. Variationen im Schnittmuster treten im Bereich der Aminosäuren 50 bis 95 auf, bei dem dephosphorylierten α -Casein hydrolysiert YggG öfter als in der phosphorylierten Variante. Auffällig ist dabei, dass häufiger in der Umgebung

der dephosphorylierten Aminosäuren geschnitten wird. Die Schnittstellen im Bereich 151 bis 193 sind bei beiden Substraten identisch. Als eindeutige Schnittstelle ist F/F zu betrachten, sie ist in beiden Substraten gleich stark vertreten. Das bedeutet die meisten in der massenspektrometrischen Analyse detektierten Fragmente besaßen F/F als Schnittstelle. Jedoch kann es sich auch bei den anderen Fragmenten um potentiell richtige Schnittstellen handeln. Um das zu analysieren und ein Peptid zur Charakterisierung von YggG sowie für einen potentiellen Assay zu finden, wurden verschiedene Peptide hergestellt und im Nachfolgenden untersucht.

4.2.3.7 Peptidanalyse

Anhand der Schnittmuster aus dem α -Caseinverdau, wurden Peptide mit den möglichen Schnittstellen synthetisiert. Die Peptidsynthese und anschließende massenspektrometrische Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Patrick Hauske, AG Kaiser, CGC Dortmund. Um die Peptide zu testen wurden 100 μ M Peptid mit 0,8 μ M YggG in 100 μ l Phosphatpuffer für 4 h bei 37°C inkubiert. Nach der Analyse wurde der Anteil der hydrolysierten Peptide an der Gesamtmenge des Peptids bestimmt.

FVAPFPEVF/GK/E/K/VN	QAMEDIKQM/EAE/SIG
V/LNENLLR/F/FVAPFP*	EDIKQM/EAE/SISSSE
ENLLR/F/FV*	SSSEEIVPN/SVEQK/H
LNENLLR/F/FV*	IVPNS/VEQK/HIQKEE
E/V/LNENLLR/F/FV*	VPLGTQYTD/APS/FSE
E/V/LNENLLR/F/YV*	GTQYTD/APS/FSDIPN
APFPEVF/GK/E/K/VNEL	PIGSENSEK/TTMPLV
PFPEVF/GK/E/K/VNELG	GTQYTD/APS/FSDIPN/PIGSENSEK/TTMPLW
F/GK/E/K/VNEL/SK/DIGG	K/VNEL/SK/DIGSE/S/TEDQAMEDIKQM/EAE/SIS
EL/SK/DIGSE/S/TEDQA	

Tab. 4-4: Getestete Peptide. Aufgeführt sind die Peptide in den Proteolysereaktionen mit YggG getestet wurden. Die Peptide, die von YggG abgebaut wurden, sind mit einem Stern gekennzeichnet die P1-Position mit Schnittstelle (F/) ist dabei grün markiert. Die potentiellen Schnittstellen sind mit roten Strichen dargestellt.

Nur Peptide mit FF in der Sequenz werden durch YggG hydrolysiert (Abb. 4-30), dies bestätigt die Ergebnisse aus der massenspektrometrischen Analyse der Schnittstellen, die besagen, dass F/F die wahrscheinlichste Schnittstelle ist. Der stärkste Abbau zeigt sich im Proteolyseansatz des Peptids VLNENLLRFFVAPFP. Das Peptid ENLLRFFV zeigt mit 7,7% einen eher schwachen Abbau. Die Peptide LNENLLRFFV und EVLNENLLRFFV zeigen mit 26,5 und 20,1% einen ähnlich starken Abbau.

Der Austausch von Phenylalanin durch Tyrosin im Substrat EVLNENLLRFFV führt zu einem Rückgang der Hydrolyse von 20% auf 3%. Das Peptid EVLNENLLRFFV lässt aufgrund eines Abbaus von 20,1% nach oben und unten genug Variationsmöglichkeiten um verschiedene

Bedingungen für die YggG-Aktivität zu testen. Weshalb mit diesem im Weiteren eine Charakterisierung durchgeführt wurde.

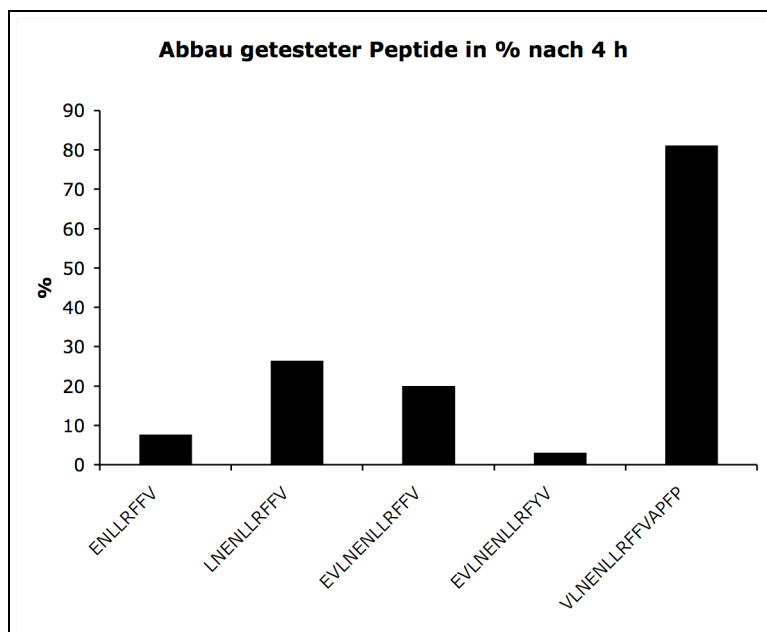
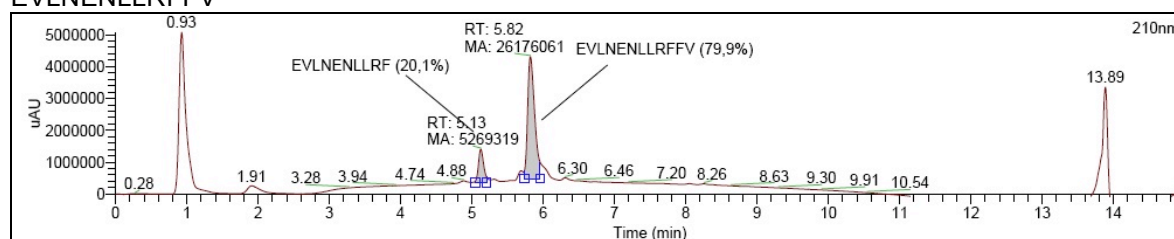


Abb. 4-30: Proteolyse verschiedener Peptide. Dargestellt ist der Abbau der getesteten Peptide durch YggG nach 4 h. Die Menge des proteolysierten Peptids ist in % (in Bezug auf die Ausgangsmenge, unverdautes Peptid) angegeben.

EVLNENLLRFFV



VLNENLLRFFVAPFP

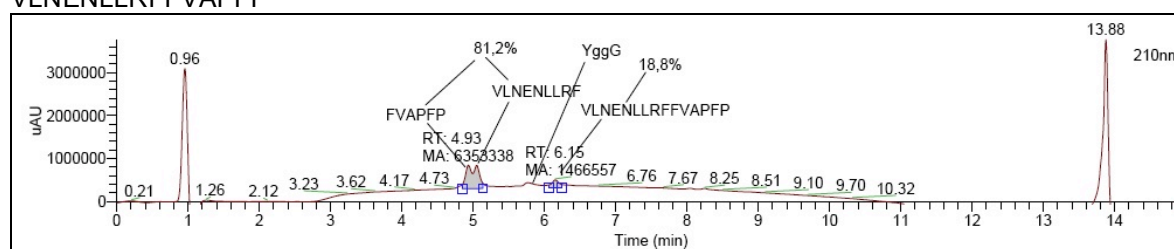


Abb. 4-31: UV-Spektren von EVLNENLLRFFV und VLNENLLRFFVAPFP. Als Beispiel sind zwei UV-Spektren abgebildet bei denen die Menge oberhalb der proteolysierten Fragmente und des Ausgangspeptides in % angegeben ist. Die Y-Achse gibt die µAU 'micro absorbance units' und die X-Achse die Laufzeit in min an.

In Abb. 4-31 sind beispielhaft zwei UV-Spektren dargestellt. Das erste Spektrum zeigt den Abbau von Peptid EVLNENLLRFFV durch YggG nach 4 h. In diesem Spektrum ist das Proteolyseprodukt EVLNENLLRFF sichtbar, das Dipeptid FV ließ sich allerdings nicht erfassen. Im zweiten Spektrum ist die Proteolyse des Peptids VLNENLLRFFVAPFP durch YggG zu sehen. Hier lassen sich beide Abbaufragmente FVAPFP und VLNENLLRFF

erkennen. Alle weiteren Spektren der im Balkendiagramm (Abb. 4-30) dargestellten Proteolyseansätze befinden sich im Anhang.

4.2.3.8 Zeitverlauf der Peptidhydrolyse

Um die Proteolyse des Peptids EVLNENLLRFFV über die Zeit zu verfolgen wurde 100 μ M Peptid mit 0,8 μ M YggG in 100 μ l Phosphatpuffer für 1 h, 4 h, 12 h und 24 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die massenspektrometrische Analyse.

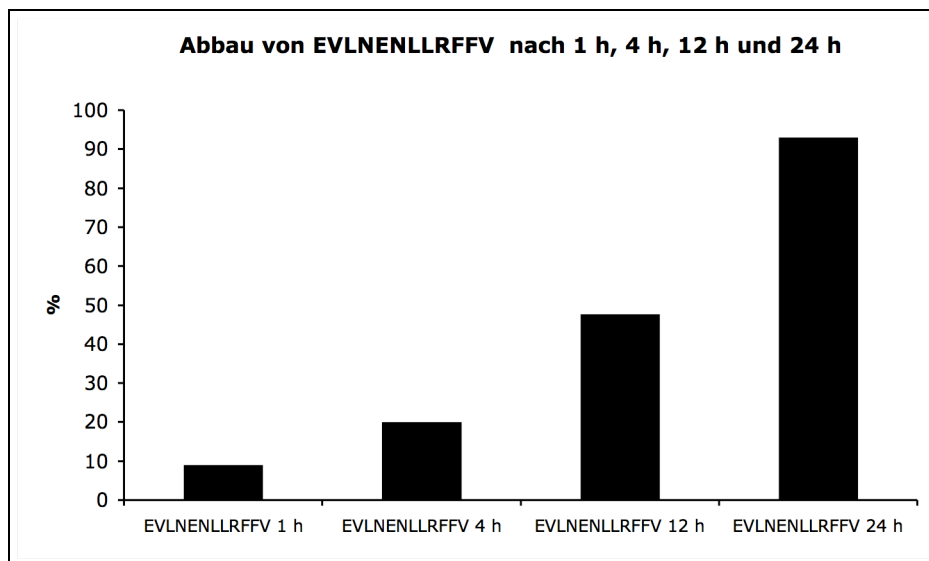
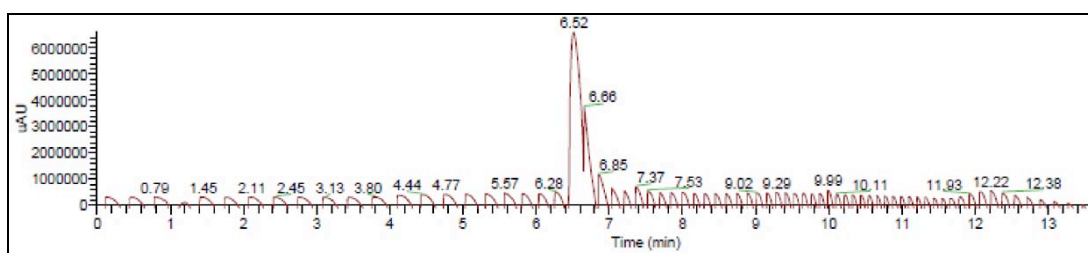


Abb. 4-32: Zeitreihe der Peptidhydrolyse durch YggG. Dargestellt ist der Abbau des Peptids EVLNENLLRFFV durch YggG nach verschiedenen Zeitpunkten. Die Menge des proteolysierten Peptids ist in % (in Bezug auf die Ausgangsmenge, unverdautes Peptid) angegeben.

EVLNENLLRFFV-Kontrolle



EVLNENLLRFFV + YggG 24 h

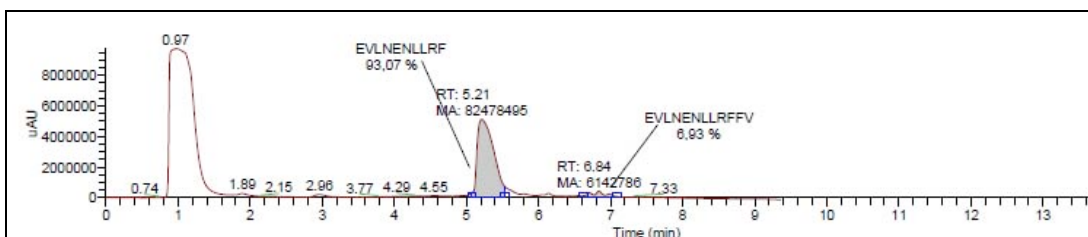


Abb. 4-33: Spektrum der Peptidproteolyse. Als Beispiel sind zwei UV-Spektren abgebildet bei denen die Menge oberhalb der proteolysierten Fragmente und des Ausgangspeptides in % angegeben ist. Oben: Kontrollspektrum von EVLNENLLRFFV. Unten: Abbau von EVLNENLLRFFV durch YggG nach 24 h. Die Y-Achse gibt die μ AU 'micro absorbance units' und die X-Achse die Laufzeit in min an.

Der Abbau von EVLNENLLRFFV liegt nach 1 h Inkubation bei 9% (Abb. 4-32). Nach 4 h ist der Anteil des proteolysierten Fragments EVLNENLLRF bei 20,1% und steigt über Nacht auf 47,7% und nach 24 h 93% an. Somit ist erst nach 24 h ein annähernd vollständiger Umsatz des Peptids erreicht.

4.2.3.9 pH-Reihe

Die Untersuchung der Aktivität von YggG in Gegenwart unterschiedlicher pH-Werte erfolgte durch die Proteolyse von α -Casein und EVLNENLLRFFV. Dabei wurde eine pH-Reihe im Bereich von 5,0 bis 11,0 getestet. Die Reaktionspuffer wurden in einer Konzentration von 50 mM Puffersubstanz und 150 mM NaCl angesetzt. Zuerst wurde ein α -Caseinverdau mit einer Pufferreihe, von 28 Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten, durchgeführt. Dafür wurden 50 μ g α -Casein und 5 μ g YggG, in 100 μ l Puffer eingesetzt. Die Kontrolle der Proben erfolgte über ein Bis-Tris-Gel und anschließende Coomassiefärbung.

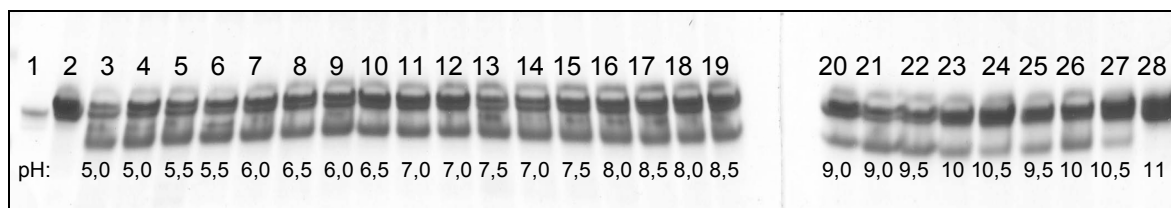


Abb. 4-34: pH-Reihe α -Caseinverdau: Die Proteolyse von α -Casein durch YggG in Abhängigkeit von verschiedenen pH-Werten wurde bei 37°C für 4 h inkubiert. Als Kontrollen wurden YggG (1) und α -Casein (2) alleine mitgeführt. Für den α -Casein-Abbau eingesetzt: 50 μ g α -Casein + 5 μ g. Die Erklärung der Probennummern bezgl. Puffer und pH-Wert sind den unten aufgeführten Tabellen zu entnehmen. 1:YggG, 2: α -Casein, 3: Essigsäure, 4-5: Propionsäure, 6-8: MES, 9-11: Bis-Tris, 12-13: HEPES, 14-17: Tris, 18-20: Bicin, 21-24: Ethanolamin, 25: Natriumcarbonat, 26-28: CAPS

Die Proteolyse von α -Casein durch YggG unterscheidet sich in dem pH-Bereich von 5,0 -8,5 nur minimal (Abb. 4-34). Ab einem pH-Wert von 9,0 ist jedoch eine deutliche Abnahme des α -Caseinabbaus zu erkennen. Ab dem pH 10,5 findet nur noch eine sehr geringe Hydrolyse statt und ab einem pH-Wert von 11 ist kein Abbau des Substrats mehr möglich. Um diese Ergebnisse zu verifizieren wurde eine Auswahl an Puffern in der Proteolyse des Peptids EVLNENLLRFFV getestet. 100 μ M EVLNENLLRFFV und 0,8 μ M YggG wurden in den Puffern Propionsäure pH 5,0, MES pH 6,0, HEPES pH 7,0, Tris pH 8,0, Bicin pH 9,0, Ethanolamin pH 10,0 und CAPS pH 11,0 eingesetzt.

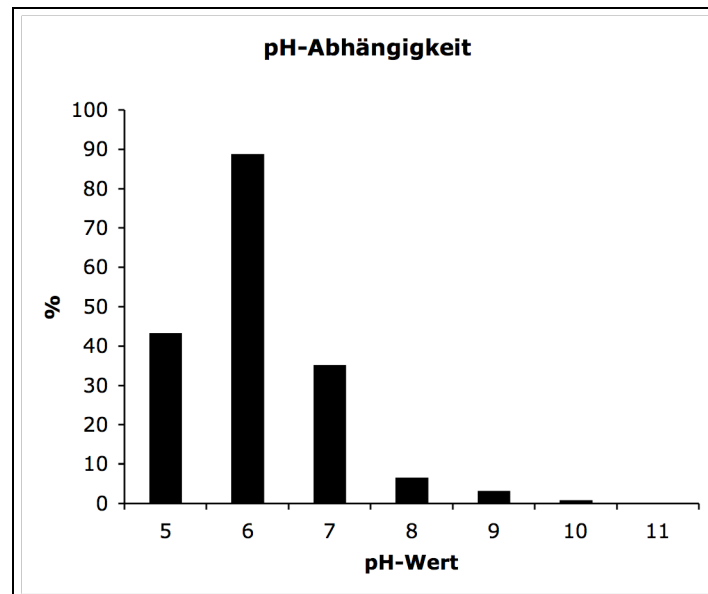


Abb. 4-35: pH-Abhängigkeit der Peptidproteolyse durch YggG. Dargestellt ist der Abbau des Peptids EVLNENLLRFFV durch YggG in Abhängigkeit von verschiedenen pH-Werten. Die Menge des proteolysierten Peptids ist in % (in Bezug auf die Ausgangsmenge, unverdautes Peptid) angegeben. Eingesetzt wurden: 100 μ M Peptid + 0,8 μ M YggG

Die Ergebnisse in Abb. 4-35 weisen auf eine eindeutige pH-Abhängigkeit von YggG hin, welche im α -Caseinverdau nur bedingt zu erkennen ist. Der stärkste Abbau zeigt sich bei einem pH-Wert von 6,0. Diese Tendenz ist im α -Caseinverdau nicht zu sehen. Die Aktivität von YggG ist bei einem pH von 5,0 geringfügig höher als bei 7,0. Ein rapider Abfall des Peptidumsatzes zeigt sich ab einem pH-Wert von 8,0, dieser setzt sich in Richtung der steigenden pH-Werte stufenweise fort. Ähnlich wie im α -Caseinverdau ist ab dem pH 10,0 so gut wie kein Abbau mehr vorhanden und bei dem pH von 11,0 ist die YggG-Aktivität aufgehoben. Somit scheint YggG im eher niedrigen pH-Bereich von 5-6 seine höchste Aktivität zu besitzen.

4.2.3.10 Salzreihe

Zur Untersuchung des Einflusses der Ionenstärke auf die Aktivität von YggG, wurde eine Pufferreihe mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen getestet. Dabei wurde ein Bereich von 10 bis 250 mM NaCl abgedeckt. In den Proteolysereaktionen wurde zum einen α -Casein und zum anderen das Peptid EVLNENLLRFFV als Substrat eingesetzt. Die Proben wurden anschließend über SDS-PAGE und Coomassiefärbung bzw. massenspektrometrisch analysiert.

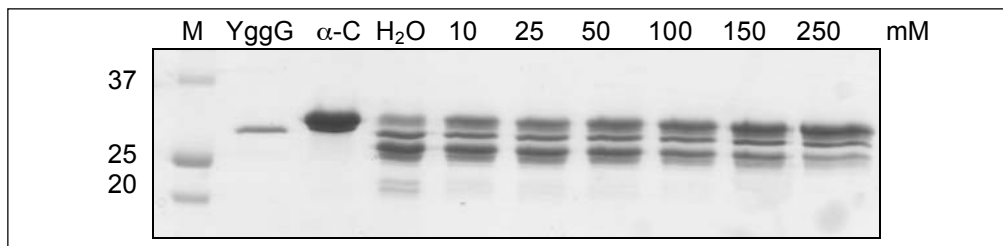


Abb. 4-36: Coomassiesiegel der Salzreihe. Die Proteolyseansätze von α Casein (α -C) durch YggG in Abhängigkeit von verschiedenen NaCl-Konzentrationen wurden bei 37°C für 4 h inkubiert. Als Kontrollen wurden α Casein und YggG alleine mitgeführt. α -Casein-Abbau: 50 μ g α -Casein + 5 μ g YggG; Puffer: 10 mM NaH_2PO_4 pH 7,0, NaCl-Konzentrationen in mM über dem Gel beschrieben

Mit zunehmender Ionenstärke nimmt die Proteolyse des α -Caseins durch YggG ab. Abb. 4-36 zeigt den stärksten Abbau in Wasser, die Proteolysebanden werden in Richtung der steigenden NaCl-Konzentration weniger. Um zu analysieren, ob dieser Effekt auf YggG oder die Konformation des α -Caseins zurückzuführen ist, wurde der Peptidverdau massenspektrometrisch analysiert.

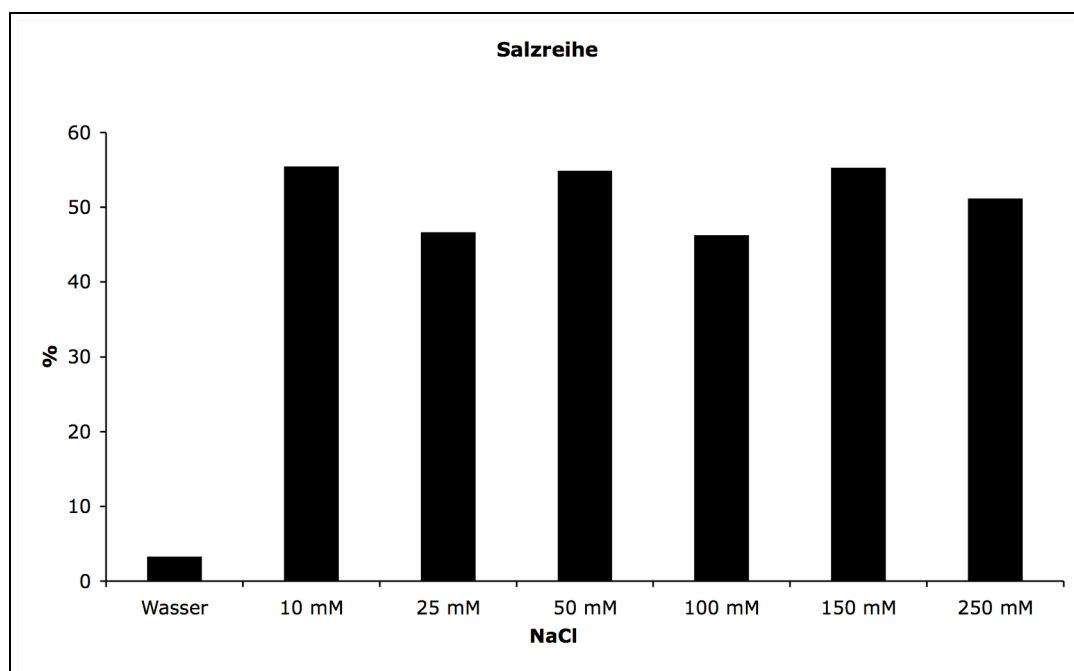


Abb. 4-37: Salzreihe des Peptidabbaus: Dargestellt ist der Abbau des Peptids EVLNENLLRFFV durch YggG in Abhängigkeit von verschiedenen NaCl-Konzentrationen. Die Menge des proteolysierten Peptids ist in % (in Bezug auf die Ausgangsmenge, unverdautes Peptid) angegeben. Eingesetzt wurden: 100 μ M Peptid + 0,8 μ M YggG; Puffer: 10 mM NaH_2PO_4 pH 7,0, NaCl in mM

Der Abbau von EVLNENLLRFFV durch YggG bleibt unter dem Einfluss verschiedener Salzkonzentrationen unverändert (Abb. 4-37). Interessant ist jedoch, dass ein Abbau in Wasser so gut wie nicht stattfindet, während α -Casein auch in Wasser durch YggG hydrolysiert wird. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass die abnehmende Proteolyse des α -Caseins nur auf dessen Konformation, die sich abhängig vom Salzgehalt ändert, zurückzuführen ist. Für die Aktivität von YggG ist hingegen die Gegenwart von Salzen

vorteilhaft, wobei die Konzentration an NaCl jedoch weniger relevant ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich zur Untersuchung der YggG-Abhängigkeit von Salzkonzentrationen das Peptid EVLNENLLRFFV besser eignet als α -Casein. Somit wird für die nachfolgenden Analysen des Einflusses von Puffer- und ZnCl_2 -Konzentrationen nur das Peptid EVLNENLLRFFV eingesetzt.

4.2.3.11 Pufferkonzentrationen

Um den Einfluss der Pufferkonzentration auf die Aktivität von YggG zu untersuchen, wurde eine Pufferreihe mit unterschiedlichen NaH_2PO_4 -Konzentrationen getestet. Dabei wurde ein Bereich von 10 bis 250 mM NaH_2PO_4 abgedeckt. In den Proteolysereaktionen wurden 100 μM Peptid EVLNENLLRFFV und 0,8 μM YggG eingesetzt. Die Ansätze wurden anschließend massenspektrometrisch analysiert.

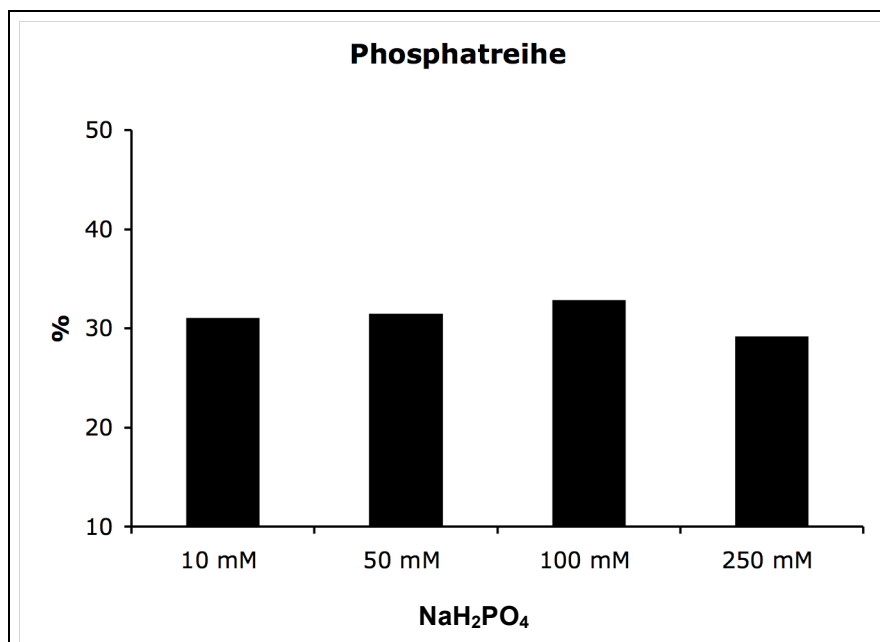


Abb. 4-38: Phosphatreihe der Peptidhydrolyse. Dargestellt ist der Abbau des Peptids EVLNENLLRFFV durch YggG in Abhängigkeit von verschiedenen NaH_2PO_4 -Konzentrationen. Die Menge des proteolysierten Peptids ist in % (in Bezug auf die Ausgangsmenge, unverdautes Peptid) angegeben. Eingesetzt wurden: 100 μM Peptid + 0,8 μM YggG; Puffer: 100 mM NaCl pH 7,0, NaH_2PO_4 in mM

Abb. 4-38 zeigt, dass die getesteten Pufferkonzentrationen keinen Einfluss auf die Hydrolyse von EVLNENLLRFFV durch YggG haben. Somit scheinen die Pufferkonzentrationen, die hier eingesetzt wurden, nicht relevant für die Aktivität von YggG zu sein. Die Ergebnisse sind ähnlich wie die der Salzzreihe, eine Zunahme der Ionenstärke besitzt keinen Einfluss auf die Aktivität von YggG.

4.2.3.12 Einfluss von ZnCl_2 auf die Aktivität von YggG

Da YggG eine putative Metalloprotease mit einem Zinkion im aktiven Zentrum ist, soll der Einfluss von verschiedenen ZnCl_2 -Konzentrationen auf die Aktivität analysiert werden. Dazu wurde der Puffer (10 mM NaH_2PO_4 , 10 mM NaCl pH 7,0) mit ZnCl_2 in einem Bereich von 0–1 mM versetzt. In den Proteolyseansätzen wurden 100 μM EVLNENLLRFFV und 0,8 μM YggG eingesetzt. Die Ansätze wurden anschließend massenspektrometrisch analysiert.

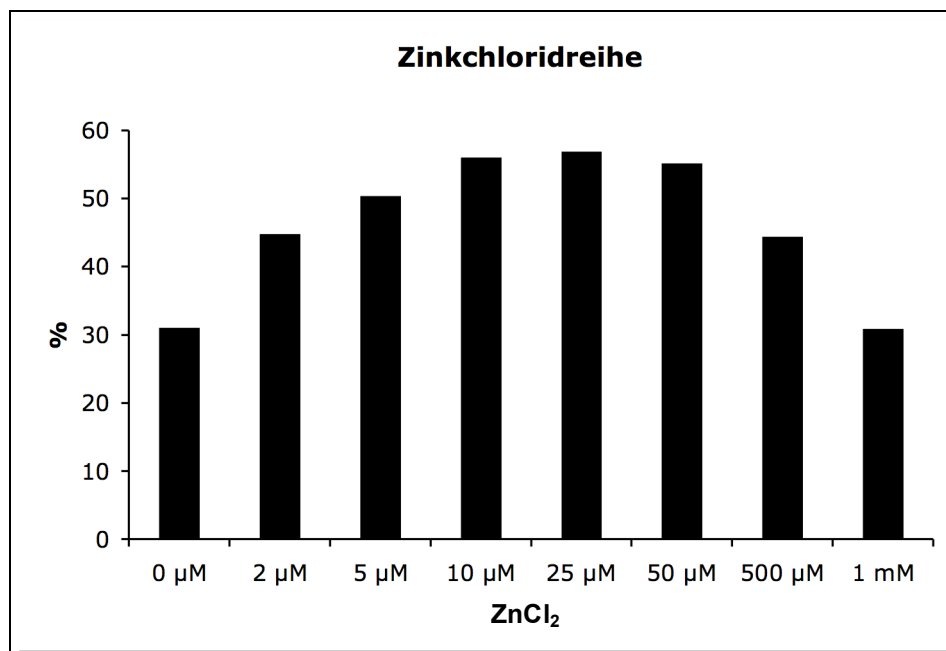


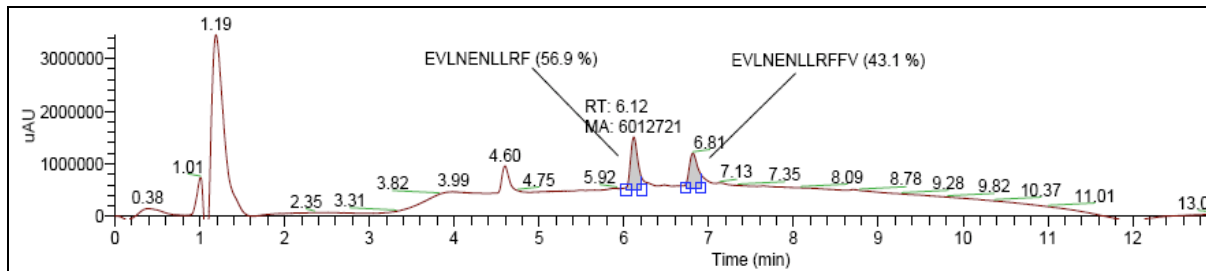
Abb. 4-39: Zinkchloridreihe der Peptidhydrolyse. Dargestellt ist der Abbau des Peptids EVLNENLLRFFV durch YggG in Abhängigkeit von verschiedenen ZnCl_2 -Konzentrationen. Die Menge des proteolysierten Peptids ist in % (in Bezug auf die Ausgangsmenge, unverdautes Peptid) angegeben. Eingesetzt wurden: 100 μM Peptid + 0,8 μM YggG; Puffer: 10 mM NaH_2PO_4 , 10 NaCl mM pH 7,0, ZnCl_2 in mM

Die Zugabe von ZnCl_2 besitzt einen Einfluss auf die Aktivität von YggG (Abb. 4-39). Bereits bei einem Gehalt von 2 μM ZnCl_2 steigt der Abbau von EVLNENLLRFFV um den Faktor 1,4. Dieser Anstieg setzt sich bis zur ZnCl_2 -Konzentration von 25 μM fort. Der Peptidumsatz erhöht sich von 30% bei 0 μM ZnCl_2 auf 56% mit 25 μM ZnCl_2 . Somit ist die Substrathydrolyse um das 1,8-fache, also fast um das Doppelte gestiegen. Ab einer ZnCl_2 -Konzentration von 50 μM ist eine leichte Abnahme der Aktivität von YggG zu erkennen, die bei 1 mM ZnCl_2 wieder das Ausgangsniveau erreicht.

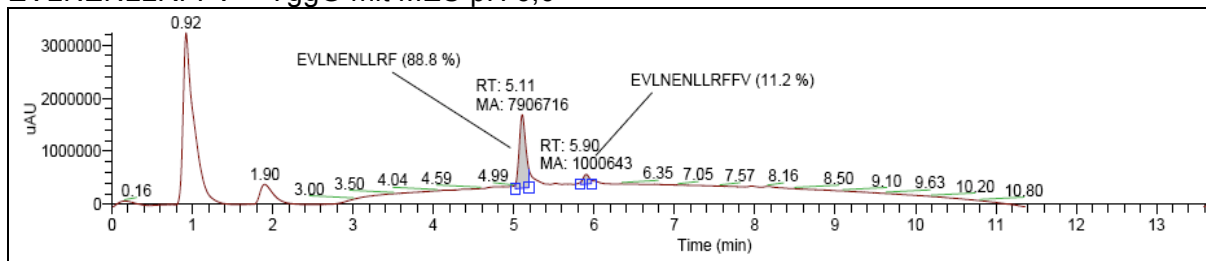
4.2.3.13 Optimierte Pufferbedingungen für die Aktivität von YggG

Werden die Daten der vorherigen Versuche zur Aktivitätscharakterisierung von YggG zusammengefasst, sollten die idealen Pufferbedingungen für YggG 50 mM MES, 150 mM NaCl und 25 μ M ZnCl₂, pH 6,0 sein. Diese wurden in einer weiteren Proteolyse von 100 μ M EVLNENLLRFFV und 0,8 μ M YggG getestet.

EVLNENLLRFFV + YggG mit 25 μ M ZnCl₂



EVLNENLLRFFV + YggG mit MES pH 6,0



EVLNENLLRFFV + YggG mit MES pH 6,0 + 25 μ M ZnCl₂

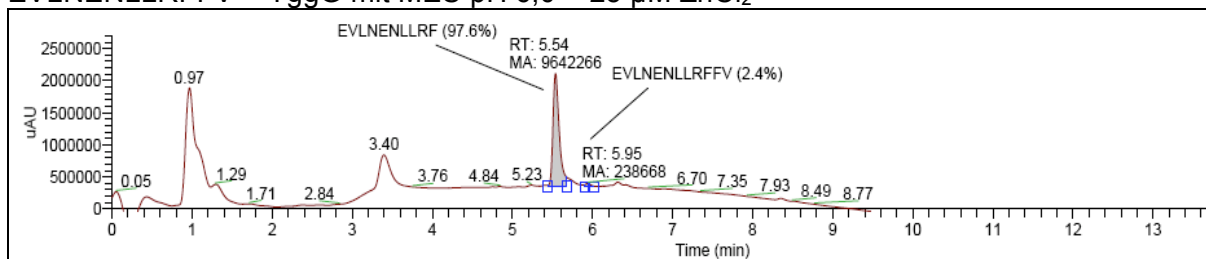


Abb. 4-40: Spektren des EVLNENLLRFFV-Proteolyse in verschiedenen Puffern. Die UV-Spektren zeigen den Unterschied der Proteolyse vom EVLNENLLRFFV durch YggG in drei verschiedenen Pufferbedingungen. Oberhalb der proteolysierten Fragmente und des Ausgangs-peptides sind die Mengen in % angegeben ist. Die Beschreibung der Pufferbedingungen sind oberhalb der Spektren zu entnehmen.

Die oberen zwei Spektren zeigen die Proteolyse von EVLNENLLRFFV durch YggG unter den Bedingungen, die in der Analyse verschiedener Pufferfaktoren (4.2.3.9 und 4.2.3.12), einen Einfluss auf die YggG-Aktivität besaßen und sich als beste herausstellten. So liegt der Abbau von EVLNENLLRFFV mit 25 μ M bei 56,9% und mit MES pH 6,0 bei 88,8%. Eine Kombination beider Bedingungen führt zu einem nahezu vollständigen Abbau von 97,6%. Somit erweist sich diese Pufferzusammensetzung als die bisher effektivste für die Aktivität von YggG.

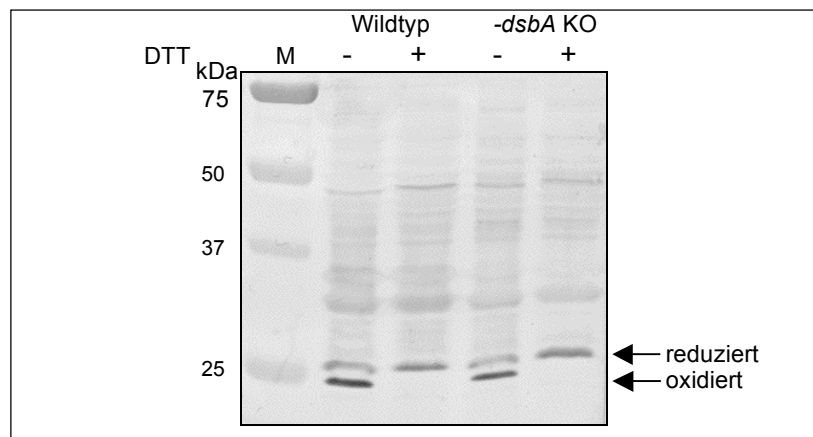


Abb. 4-42: Western Blot des Disulfidbrückennachweis in YggG. Der Western Blot zeigt YggG mit (+) und ohne (-) DTT im Wildtyp BW30270 und *dsbA* Deletionsstamm. Der Ganzzellextrakt (3.2.3.1) wurde mit und ohne DTT hergestellt. Der YggG-Antikörper wurde 1:20000 eingesetzt. M :Marker

Der Western Blot (Abb. 4-42) weist beide Formen des YggG auf. In den Proben mit DTT lässt sich nur die reduzierte, höher laufende YggG-Variante erkennen. In den Proben ohne DTT ist vor allem die tiefer laufende Bande der oxidierten YggG-Form zu sehen, jedoch liegt auch hier ein geringer Teil reduziert vor. Die Disulfidbrücke in YggG bildet sich auch im *dsbA* Deletionsstamm. Dies deutet daraufhin, dass sie sich auch durch Luftoxidation ausbilden kann. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich die Mengen an oxidierten YggG im *dsbA* Deletionsstamm zum Wildtyp unterscheiden. Diese Ergebnisse liefern den ersten Hinweis darauf, dass YggG eine Disulfidbrücke enthält. Die Relevanz dieser wurde deshalb im Nachfolgenden genauer analysiert.

4.2.4.2 Untersuchung des Einflusses der Disulfidbrücke auf die Struktur von YggG

Zur Untersuchung des oligomeren Zustandes von YggG in Gegenwart von DTT wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Dafür wurden 200 µg α -Casein mit 1 mM DTT 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend über die Gelfiltrationssäule Superdex 200 5/150 GL aufgetrennt. Die Elutionsfraktionen des Laufs von α -Casein mit YggG wurden mittels SDS-PAGE und anschließende Coomassiefärbung kontrolliert. Der Verlauf der Gelfiltration (Abb. 4-43) zeigt, dass sich die Oligomerisierungszustände von YggG in Gegenwart der reduzierenden Agens DTT nicht verändern. Den Vergleich liefert die Gelfiltration unter Punkt 4.2.2.1. Die Elutionsvolumina von YggG sind mit und ohne DTT mit 1,88 ml und 2,09 ml bei beiden Läufen identisch. Somit liegt YggG auch in reduzierter Form hauptsächlich als Monomer und teilweise als Dimer vor. Dass YggG in diesem Lauf tatsächlich reduziert ist,

zeigt das Coomassiegel (Abb. 4-43), hier läuft der Großteil von YggG höher (reduzierte Form) und ein geringerer Anteil in den Fraktionen 20-23 niedriger (oxidierte Form).

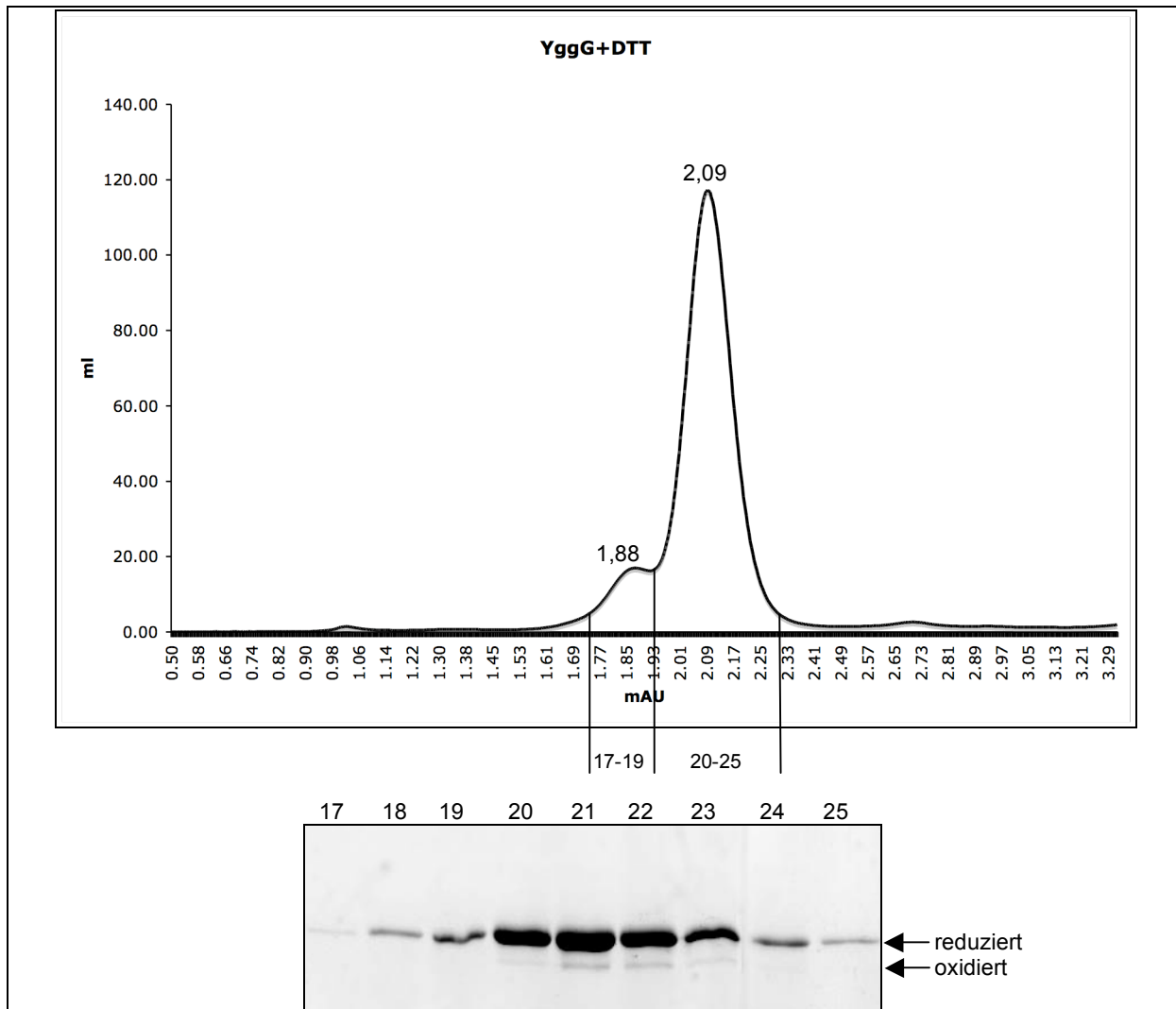


Abb. 4-43: Gelfiltration von YggG in Gegenwart von DTT. Der Lauf der Gelfiltration von YggG wurde mit 1mM DTT über die Säule Superdex 200 5/150 GL durchgeführt. Die Elutionsvolumina sind oberhalb der 'Peaks' vermerkt. Unterhalb ist das Coomassiegel der Gelfiltration von YggG mit DTT gezeigt, aufgetragen wurden 15 µl Probe, die Nummerierung entspricht den Elutionsfraktionen. Bei der oberen Bande handelt es sich um reduziertes YggG, die untere zeigt noch geringe Mengen an oxidierten YggG. Die Y-Achse gibt die mAU 'milli absorbance units' und die X-Achse das Elutionsvolumen in ml an.

Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurde zusätzlich eine Analyse durch chemisches 'Crosslinking' mit reduziertem YggG durchgeführt. Dazu wurden 5 µM gereinigtes YggG mit und ohne 1 mM DTT in 100 µl Phosphatpuffer mit Glutaraldehyd (GA) versetzt und für 2, 5 und 30 min bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle diente 5 µM reduziertes bzw. oxidiertes YggG ohne GA. Die weitere Durchführung erfolgte wie unter 3.2.3.14 beschrieben. Die Proben wurden ohne DTT-Zugabe oder Aufkochen über Bis-Tris-Gele getrennt und silbergefärbt (3.2.3.6). Das Ergebnis des chemischen 'Crosslinks' belegt die Daten der Gelfiltration. Abb. 4-44 zeigt, dass YggG in oxidiert und reduzierter Form in den gleichen oligomeren Zuständen vorliegt. Bei ca. 25 kDa ist die Bande des Monomers und bei 50 kDa die Bande

des Dimers zu erkennen. Dies deutet daraufhin, dass die Disulfidbrücke in YggG keinen Einfluss auf dessen Oligomerisierungszustand hat.

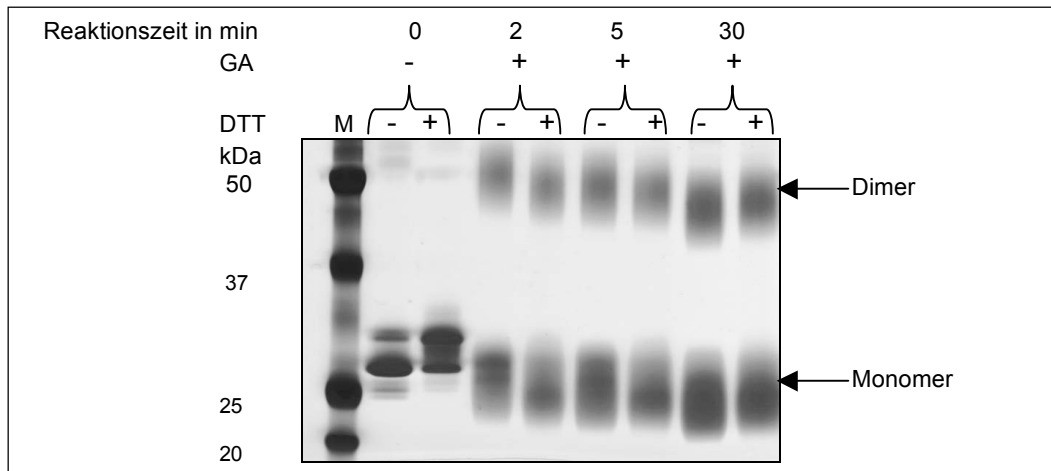


Abb. 4-44: Crosslink von reduziertem (+ DTT) und oxidiertem (- DTT) YggG. Die Proben des chemischen 'Crosslinking' (3.2.3.14) wurden mittels Silberfärbung analysiert. Gezeigt sind die Crosslinkansätze von YggG mit und ohne DTT nach verschiedenen Zeitpunkten. Aufgetragen wurden 0,5 µg Protein. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind das Monomer (25 kDa) und Dimer (50 kDa). Als Kontrolle wurde reduziertes und oxidiertes YggG ohne Glutaraldehyd aufgetragen. M: Marker

4.2.4.3 Abbau von YggG mit und ohne DTT durch DegP

DegP ist in *E.coli* eine der wichtigsten Serinproteasen, die in den Abbau von fehlgefalteten periplasmatischen Proteinen (Betton *et al.*, 1998, Spiess *et al.*, 1999) und fehlgefalteten Außenmembranproteinen (Misra *et al.*, 1991) involviert ist. Deshalb soll mit Hilfe von DegP untersucht werden, ob die Disulfidbrücke in YggG relevant für dessen Struktur ist. Verliert YggG unter reduzierenden Bedingungen seine native Struktur, müsste es durch DegP abgebaut werden. Für diesen Versuch wurden 8 µM YggG mit 0,5 µM DegP (gereinigt von Meltzer) mit und ohne 1 mM DTT für 1 h, 3 h und 6 h bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung kontrolliert.

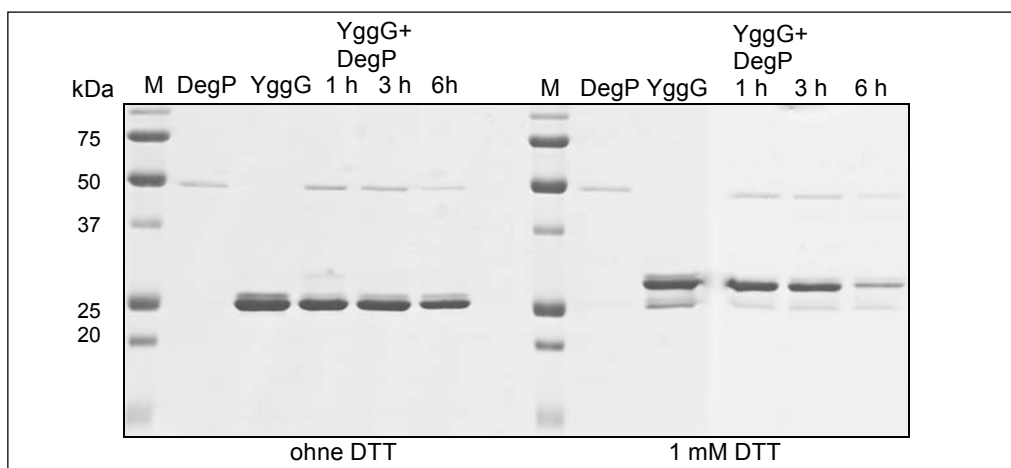


Abb. 4-45: Abbau von YggG durch DegP. SDS-PAGE Analyse des YggG-Abbaus durch DegP nach verschiedenen Zeitpunkten, mit DTT (rechts) und ohne DTT (links) bei 37°C wurde eine SDS-PAGE Analyse durchgeführt. Als Kontrollen wurden DegP und YggG aufgetragen. M: Marker.

DegP hydrolysiert das reduzierte YggG schneller als die oxidierte Form von YggG (Abb. 4-45). Insgesamt verläuft der Abbau sehr langsam. Über die Zeit betrachtet ist jedoch ein stärkerer Verdau des reduzierten YggG zu beobachten. Nach 6 h ist die reduzierte YggG Variante fast abgebaut, während von der oxidierten Form noch ca. die Hälfte vorliegt. Somit scheint die Disulfidbrücke einen Einfluss auf die Struktur von YggG zu besitzen.

4.2.4.4 Einfluss der Disulfidbrücke auf die Aktivität von YggG

Um den Einfluss der Disulfidbrücke auf die Aktivität von YggG zu untersuchen wurde eine α -Caseinproteolyse mit und ohne DTT durchgeführt. Dafür wurden 30 μ g α -Casein mit 5 μ g YggG mit und ohne 1 mM DTT in 100 μ l Phosphatpuffer für 15 min, 30 min, 1 h, 3 h und 6 h bei 37°C inkubiert. Die Proteolyseansätze wurden mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert.

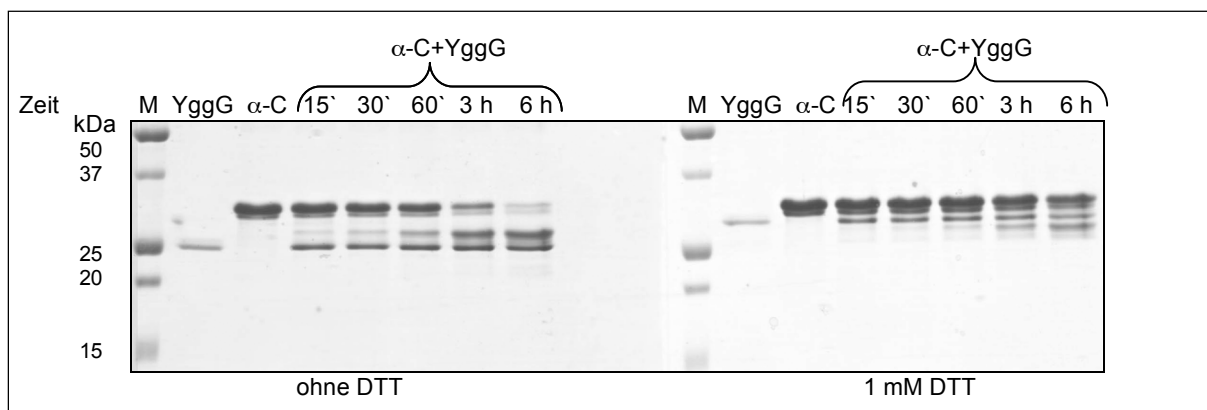
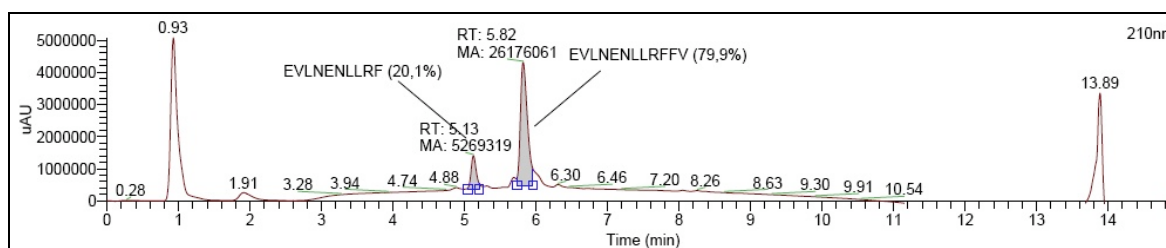


Abb. 4-46: α -Caseinabbau durch YggG mit und ohne DTT. SDS-PAGE Analyse des α -Caseinabbaus durch YggG nach verschiedenen Zeitpunkten, mit DTT (rechts) und ohne DTT (links) bei 37°C. Als Kontrollen wurden α -Casein (α -C) und YggG aufgetragen. M: Marker

Die Proteolyse des α -Casein durch YggG in Gegenwart von DTT ist deutlich reduziert (Abb. 4-46). Während nach 6 h das α -Casein durch die oxidierte Form von YggG fast vollständig hydrolysiert wurde, ist bei der reduzierten Variante nach 6 h nur ein geringer Abbau zu erkennen. Über den Zeitverlauf betrachtet, verläuft der α -Caseinabbau durch das reduzierte YggG sehr viel langsamer als in Gegenwart von oxidierten YggG. Diese Daten weisen daraufhin, dass die Disulfidbrücke in YggG einen Einfluss auf dessen Aktivität besitzt.

Um diesen Hinweis weiter zu untersuchen wurde zusätzlich die Proteolyse des Peptids EVLNENLLRFFV durch YggG in Gegenwart von DTT analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass auch hier der Abbau von EVLNENLLRFFV in Gegenwart von DTT gesenkt wird. Abb. 4-47 zeigt im oberen Spektrum den Abbau des Peptids durch die oxidierte Form von YggG, er liegt bei 20%. Das untere Spektrum des Proteolyseansatzes mit reduziertem YggG weist hingegen keinen Abbau-‘Peak’ des EVLNENLLRF-Fragments auf. Somit ist der Hinweis, dass die Disulfidbrücke die Aktivität von YggG beeinflusst, bestätigt.

EVLNENLLRFFV + YggG ohne DTT



EVLNENLLRFFV + YggG mit DTT

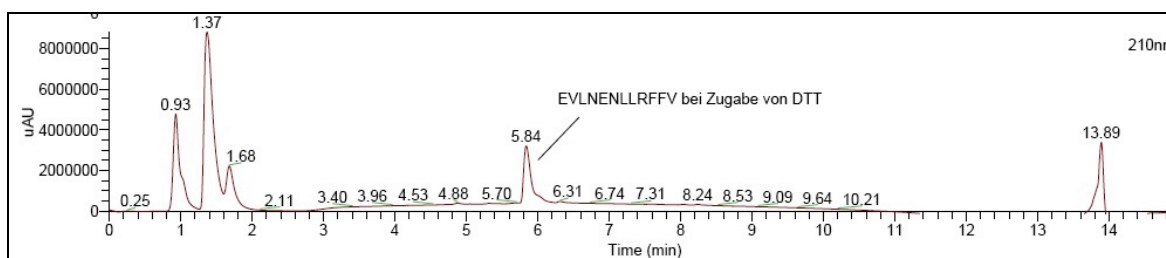


Abb. 4-47: Spektren der EVLNENLLRFFV-Proteolyse. Die UV-Spektren zeigen den Unterschied der Proteolyse vom EVLNENLLRFFV durch YggG ohne DTT und mit DTT. Oberhalb der proteolysierten Fragmente und des Ausgangspeptides sind die Mengen in % angegeben ist.

4.2.5 *In vivo* Charakterisierung

4.2.5.1 Nachweis von YggG in der Außenmembran

YggG ist, laut bioinformatischen Vorhersagen, ein Lipoprotein, das nach dem N-terminalen Cystein an zweiter Position ein Asparagin besitzt. Anhand des 'Lipoprotein-Sortierung-Signals' (1.5) müsste YggG somit in der Außenmembran verankert sein. Um die Lokalisation von YggG *in vivo* nachzuweisen, wurden vom Wildtypstamm BW30270 Fraktionen der unterschiedlichen Zellkompartimente hergestellt. Diese wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und der YggG-Gehalt über eine Western Blot Analyse ermittelt.

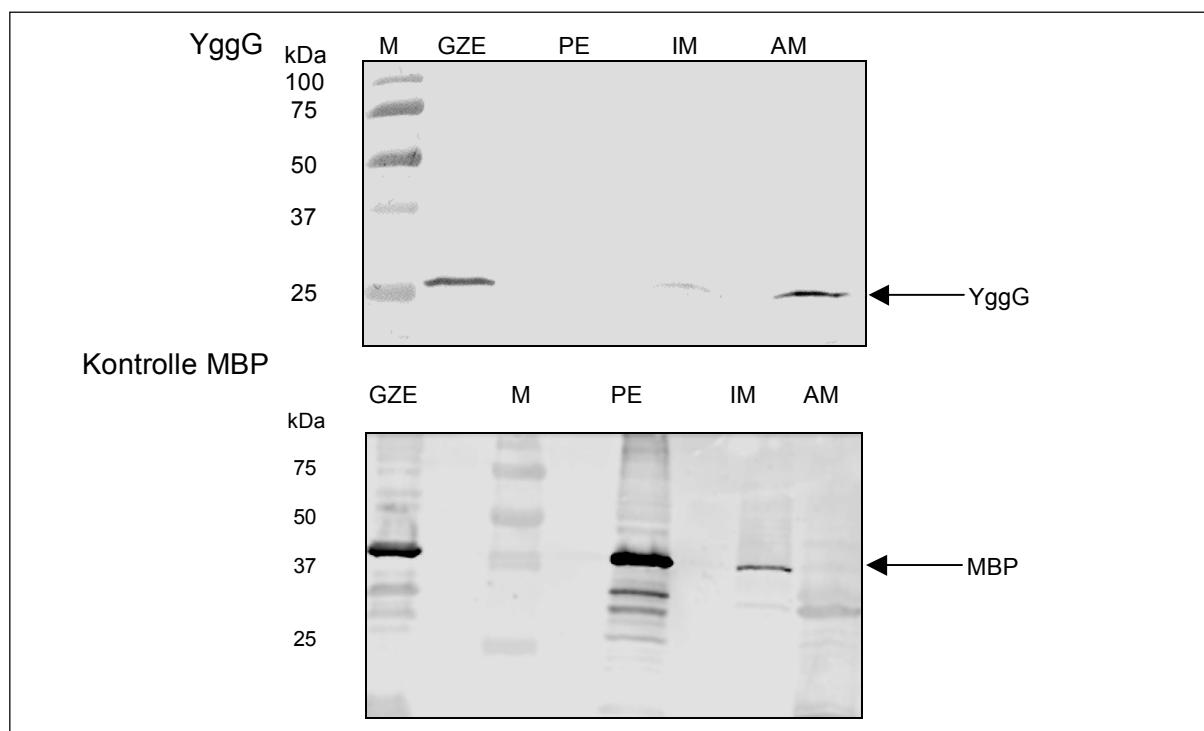


Abb. 4-48: Western Blot YggG Nachweis. Alle Fraktionen, zum Nachweis der YggG-Lokalisation, wurden aus dem Stamm BW30270 (Wildtyp) gewonnen. Aufgetragen wurden GZE: Ganzzellextrakt (Herstellung siehe 3.2.3.1), PE: periplasmatischer Extrakt (Herstellung siehe 3.2.3.9), IM: Innenmembran und AM: Außenmembran (Herstellung siehe 3.2.3.10). Der Nachweis erfolgte mit dem YggG Ak 1:20000, als Kontrolle wurde MBP nachgewiesen, MBP Ak 1:20000.

Auf dem Western Blot (Abb. 4-48, oben) ist eine eindeutige YggG-Bande in dieser Außenmembranfraktion zu erkennen. Der geringe Teil an YggG, der in der Innenmembranfraktion vorliegt, ist auf die Präparation zurückzuführen, da auch der Kontroll-Western Blot von MBP (Maltose-Binde-Protein Male), einem periplasmatischen Protein, eine schwache Bande aufweist (Abb. 4-48, unterer Western Blot). Im periplasmatischen Extrakt ist hingegen kein YggG enthalten. Somit bestätigen sich die theoretischen Hinweise, dass YggG ein in der Außenmembran verankertes Lipoprotein ist.

4.2.5.2 Co-Immunpräzipitation zur *in vivo* Substratsuche

Um potentielle native Substrate von YggG zu ermitteln, wurde eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Dafür wurde der *yggG* Stamm mit dem Leervektor pCS19 (Kontrolle), und den Plasmiden pCL4 (*yggG*/pCS19) und pYggGE131Q (*yggGE131Q*/pCS19) transformiert. Die Kulturen wurden bis zur exponentiellen Phase bei 37°C inkubiert. Die Co-Immunpräzipitation wurde wie unter 3.2.3.15 beschrieben durchgeführt. Die Induktion erfolgte mit 10 µM IPTG für 3 h bei 37°C. Der YggG-Protein-Komplex wurde mit einem Penta-His-Antikörper präzipitiert. Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung und Silberfärbung wurde die auffälligste Bande ausgeschnitten (Abb. 4-49), mit Trypsin verdaut und massenspektrometrisch analysiert (die massenspektrometrische Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Urs Lewandrowski, ISAS Dortmund).

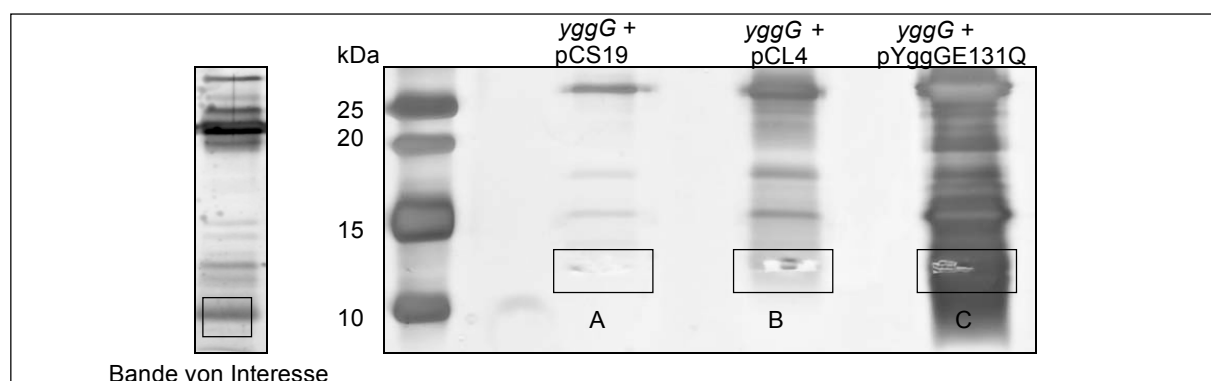


Abb. 4-49: Co-Immunpräzipitation zur Substratsuche von YggG. Das Silbergel zeigt die Co IP des *yggG* Deletionstamms mit pCS19, pCL4 (*yggG*/pCS19) und der inaktiven Form pYggGE131Q. A: Bande zur Kontrolle, B: Bande aus der Co-IP des aktiven YggG, C: Bande aus der Co-IP des inaktiven YggG

Bande A	Bande B	Bande C
Lpp (8 kDa)	Lpp (8 kDa)	Lpp (8 kDa)
	YqjD (11kDa) uncharakterisiert	YqjD (11kDa) uncharakterisiert
		Yjel (11 kDa) uncharakterisiert
		YgaU (16 kDa) uncharakterisiert
		YgdI (8 kDa) uncharakterisiert

Tab. 4-5: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse. Aufgeführt sind die Ergebnisse aus den Banden die in Abb. 4-52 gezeigt sind.

Bei allen potentiellen Substraten (Tab. 4-5) handelt es sich um noch nicht charakterisierte Proteine. Die Proteine YgdI und Yjel sind Lipoproteine, die nach dem LolA/B-Sortierungssignal in die Außenmembran gelangen. Somit könnten sie ebenfalls potentielle Interaktionspartner von YggG darstellen.

4.2.5.3 β -Galaktosidaseassay

Genau wie für den Promotor von *yfgC* wurden auch für den *yggG*-Promotor Analysen durchgeführt. Zur Untersuchung der Promotorstärke von *yggG* wurde die β -Galaktosidaseaktivität der *yggG*-Promotor-*lacZ*-Fusion (3.2.1.5 und 3.2.3.8) im Vergleich zu anderen Promotoren und unter verschiedenen Wachstumsbedingungen getestet. Diese Promotor-*lacZ*-Fusionen stammen von den Genen *malT*, (positiver Regulator des Maltoseregulons) mit niedriger Transkriptionsrate, und *malK* (Teil des Maltoseregulons) mit hoher Transkriptionsrate (Bukau *et al.*, 1986).

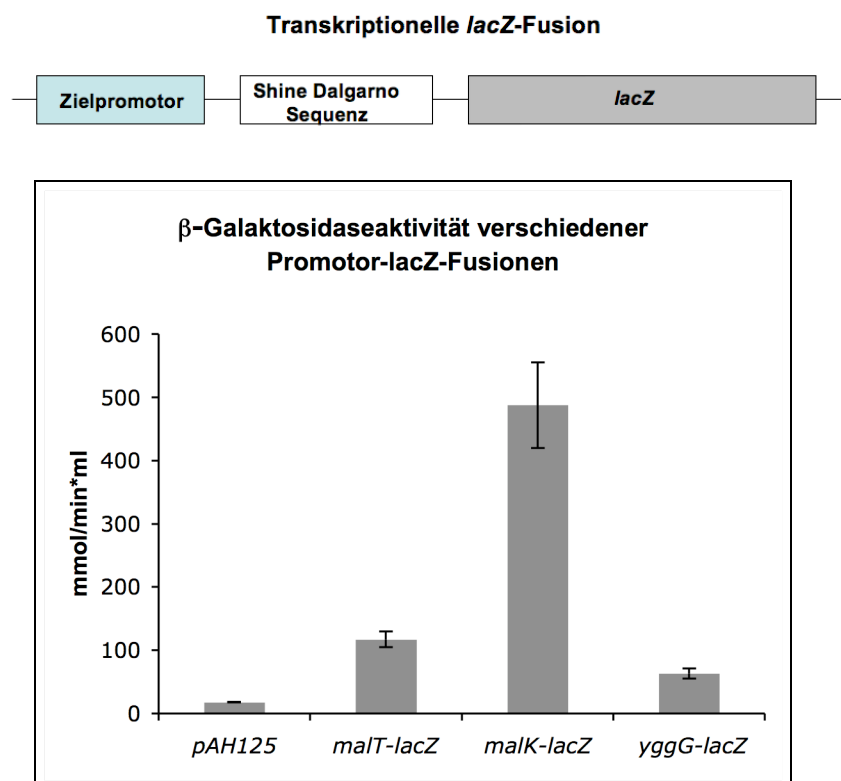


Abb. 4-50: Promotorstärken von *lacZ*-Fusionen. Oben: Schematische Darstellung der Promotor-*lacZ*-Fusionen. Unten: Vergleich der β -Galaktosidaseaktivität der Promotor-*lacZ*-Fusionen von *malT*, *malK*, *yggG* und der Kontrolle pAH125 (Kontrollstamm mit CRIM-Plasmid-Integration ohne fremden Promotor). Die Standardabweichung ist Resultat aus drei Messungen.

Die Ergebnisse des β Galaktosidaseassays zur Untersuchung der Promotorstärke von *yggG* ist in Abb. 4-50 dargestellt. Wie die β Galaktosidaseaktivität zeigt, besitzt *yggG* einen sehr schwachen Promotor, die β Galaktosidaseaktivität liegt noch unter der von *malT*, welches ebenfalls einen schwachen Promotor besitzt. MalT ist ein Transkriptionsaktivator des Maltoseregulons, dessen Genprodukte an der Aufnahme und Umsetzung von Maltose beteiligt sind (Richer und Raibaud, 1989).

Zur Untersuchung der Promotoraktivität wurde die β Galaktosidaseaktivität der *yggG*-Promotor-*lacZ*-Fusion (3.2.1.5 und 3.2.3.8) unter verschiedenen Wachstumsbedingungen getestet.

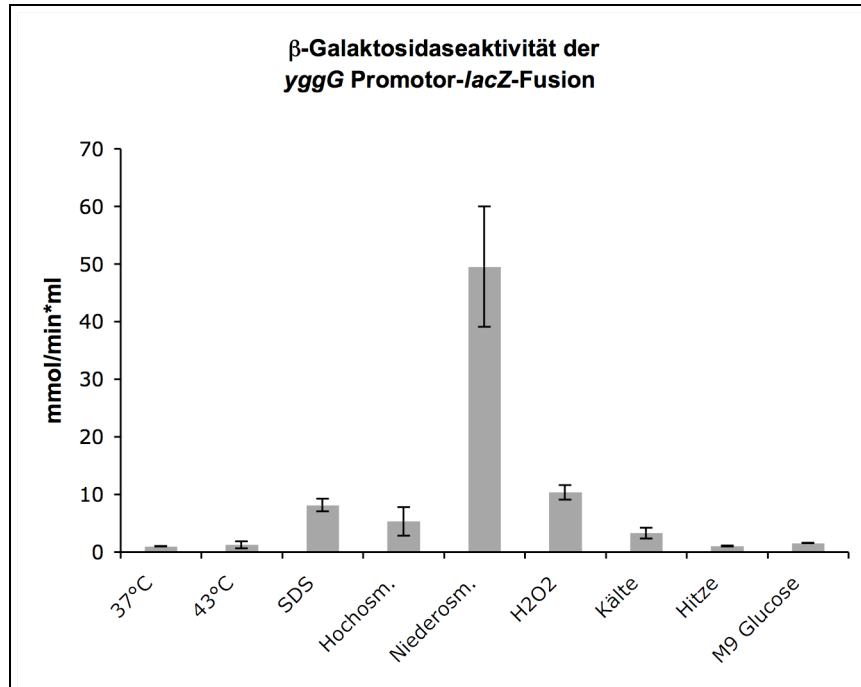


Abb. 4-51: Promotoraktivität von *yggG* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Die β -Galaktosidaseaktivität der *yggG* Promotor-*lacZ*-Fusion wurde bei verschiedenen Bedingungen untersucht. Getestete Bedingungen sind neben 37°C und 42°C, SDS: NZA + 0,5% SDS, Hochosmolares Medium: NZA + 500 mM NaCl, Niedersosmolares Medium: 1/6 NZA, H₂O₂ (oxidativer Stress): NZA+ 4 mM H₂O₂, Kälte: 3 h bei 15°C, Hitze: 30 min bei 43°C, M9 Minimalmedium + 0,4 % Glucose. Die Kulturen wurden jeweils bis zur exponentiellen Phase inkubiert. Die Aktivität bei 37°C wurde gleich 1 gesetzt und entspricht 7,3 mmol/min*ml. Die Standardabweichung ist das Resultat aus drei Messungen.

Die Analyseergebnisse der Promotoraktivität von *yggG* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen sind in Abb. 4-51 dargestellt. Eine geringe Erhöhung der β -Galaktosidaseaktivität der *yggG*-Promotor-*lacZ*-Fusion im Vergleich zu 37°C, ist bei SDS (8-fach) in hochosmolarem Medium (5-fach) und bei oxidativen Stress (10-fach) zu beobachten. Besonders signifikant ist jedoch das Ergebnis des β -Galaktosidaseassays in niederosmolarem Medium, hier zeigt sich eine eindeutige Erhöhung der Promotoraktivität. Sie ist um das 50-fache höher als die Promotoraktivität bei 37°C. Somit wird *yggG* unter dieser Wachstumsbedingung offensichtlich verstärkt transkribiert.

Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde der YggG-Gehalt unter den gleichen Bedingungen auf Proteinebene untersucht. Dazu wurden Kulturen des Wildtypstamms BW30270 in NZA-Medium bei 37°C und 43°C, sowie in niederosmolarem Medium bei 37°C bis zur exponentiellen Phase inkubiert. Zum Nachweis von YggG wurde eine OD₆₀₀ von 10 eingesetzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und der YggG-Gehalt über eine Western Blot Analyse ermittelt.

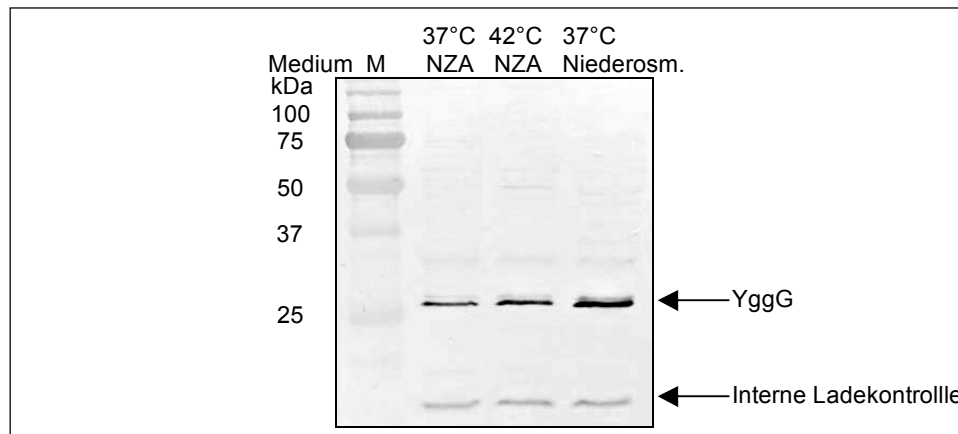


Abb. 4-52: Western Blot zur Ermittlung des YggG-Gehalts. Dargestellt ist die Proteinmenge von YggG im Stamm BW30270 (Wildtyp) in verschiedenen Medien. Die interne Ladekontrolle zeigt dass in allen Proben die gleiche Menge an Protein aufgetragen wurde; NZA: Normales Medium; Niederosm.: 1/6 NZA-Medium. Der YggG-Antikörper wurde 1:20000 eingesetzt. M: Marker

Der Western Blot (Abb. 4-52) bestätigt somit das Ergebnis des β -Galaktosidaseassays. In niederosmolarem Medium ist nicht nur die Promotoraktivität von *yggG* erhöht, sondern auch die tatsächliche Expression. Dies wird durch den erhöhten YggG-Gehalt auf Proteinebene belegt. Somit existiert ein Zusammenhang zwischen der Promotoraktivität bzw. der Expression von *yggG* und dem Stress, der durch das niederosmolare Medium induziert wird.

4.3 *E.coli*-Genome-Arrays

Die *E.coli*-Genome-Arrays (Affimetrix) wurden in Zusammenarbeit mit PD Dr. L. Klein-Hitpass, IFZ BioChip-Labor, Universitätsklinikum Essen durchgeführt. Mit Hilfe der Genome-Arrays wurde der Unterschied zwischen den Stämmen BW30270 (Wildtyp), JB14 (*yfgC::kan*), JB15 (*yggG::kan*) und den entsprechenden komplementierten Stämmen auf RNA-Ebene analysiert. Außerdem sollte untersucht werden, ob die verstärkte Expression der verschiedenen Proteasen einen regulatorischen Einfluss auf andere Gene besitzen, um so die Rolle der Proteasen in *E.coli* und evtl. Substrate zu ermitteln.

Die Kultivierung der Stämme erfolgte wie unter 3.2.1.9 beschrieben, die Expression der Gene wurde mittels Western Blot überprüft. Der *E. coli* Genome 2.0 Array wurde nach dem Affymetrix-Protokoll durchgeführt.

Aufgeführt sind nur die prägnantesten Daten, die Überschneidungen zwischen den Genen *yfgC* und *yggG* zeigen. Die auffälligsten Ergebnisse ließen sich bei den Genen aus der Flagellensynthese und Chemotaxis erkennen. Eine besonders starke Regulation ist vor allem in dem mit pCL4 (*yggG/pCS19*) komplementierten *yggG* Deletionsstamm zu erkennen. In diesem ist die Expression fast aller Gene, die in der Flagellensynthese involviert sind, abgedreht. Besonders auffallend ist dabei, dass die Expression der Gene *flhC* und *flhD*, welche die Flagellensynthese initiieren, um den Faktor 9 und 10 herunterreguliert ist (Abb. 4-53). So stark ist sonst keines der Gene reguliert. Im Vergleich dazu ist im *yggG* Deletionsstamm die Expression in den Genen *flgD*, *flgE*, *flgG* und *flgJ* nur um 0,5 erhöht (Abb. 4-53).

Der *yfgC* Deletionsstamm und der *yfgC* Deletionsstamm + pCL2 (*yfgC/pCS19*) zeigen ebenfalls eine Regulation der Gene aus der Flagellensynthese. In beiden Stämmen sind nur Gene aus der frühen und mittleren Synthesephase, betroffen (Abb. 4-54). Dabei ist die Expression der regulierten Gene im komplementierten *yfgC* Knockoutstamm um den Faktor 1,3 hochreguliert. Dies steht im Gegensatz zum komplementierten *yggG* Stamm in dem die Gene herunterreguliert sind. Die Expressionen der Gene im *yfgC* Deletionsstamm sind hingegen bis um den Faktor 0,9 geringer. Dabei sind teilweise andere Gene als im komplementierten *yfgC* Deletionsstamm reguliert. Insgesamt gehören die Gene aber zur selben Flagellensynthese-Phase. Des Weiteren ist in dem komplementierten *yfgC* Deletionsstamm die Expression der Gene der Außenmembranproteine OmpC und OmpA herunterreguliert. Diese Regulation ist in dem komplementierten *yggG* Deletionsstamm nicht zu erkennen. Alle weiteren Daten sind dem Anhang zu entnehmen.

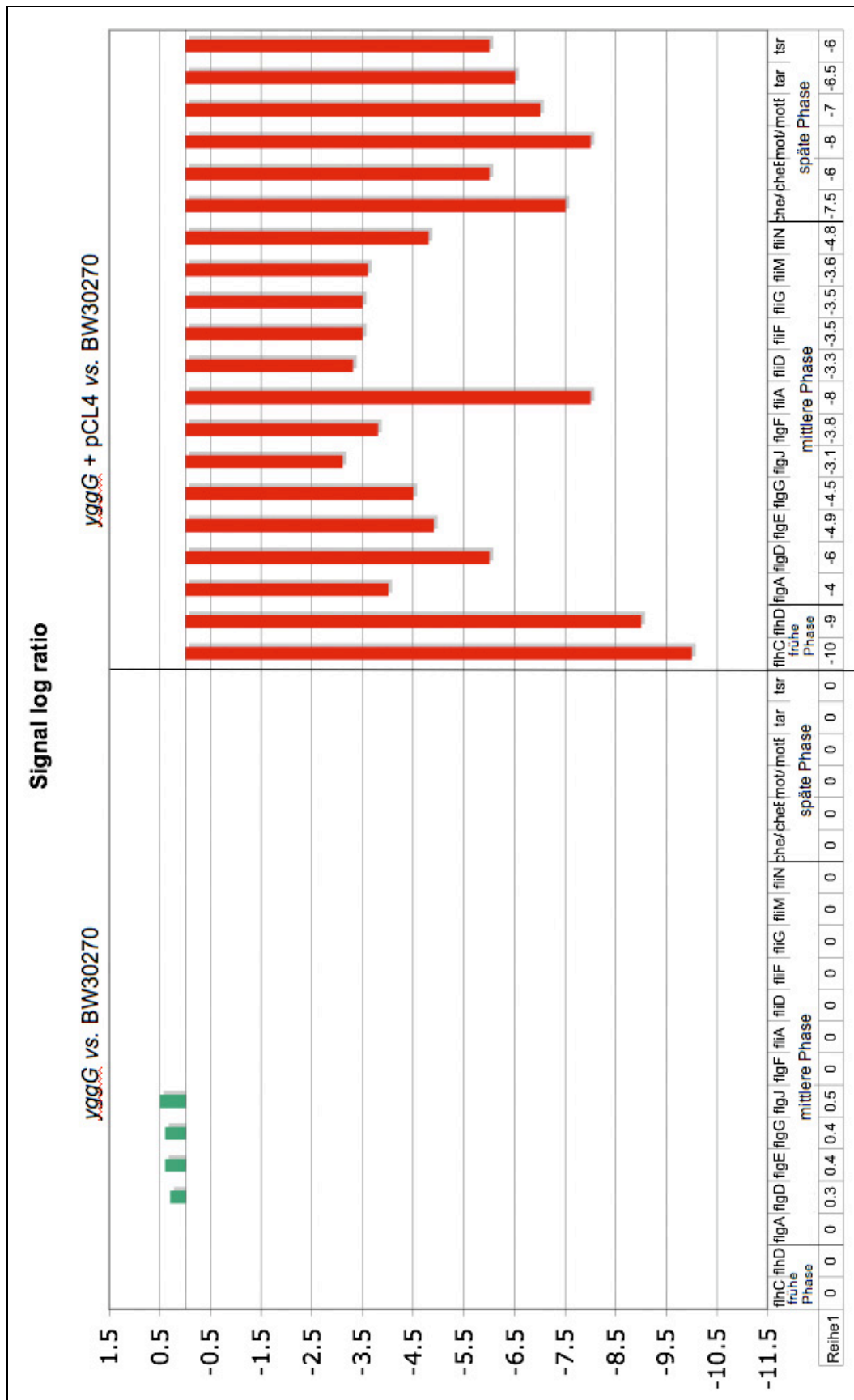


Abb. 4-53: Genexpression in dem *yggG* Deletionsstamm und *yggG* Deletionsstamm + pCL4. Dargestellt ist der signal log ratio der Gene der frühen, mittleren und späten Phase der Flagellensynthese. Erhöhte Regulationen sind in grün, niedrige in rot dargestellt

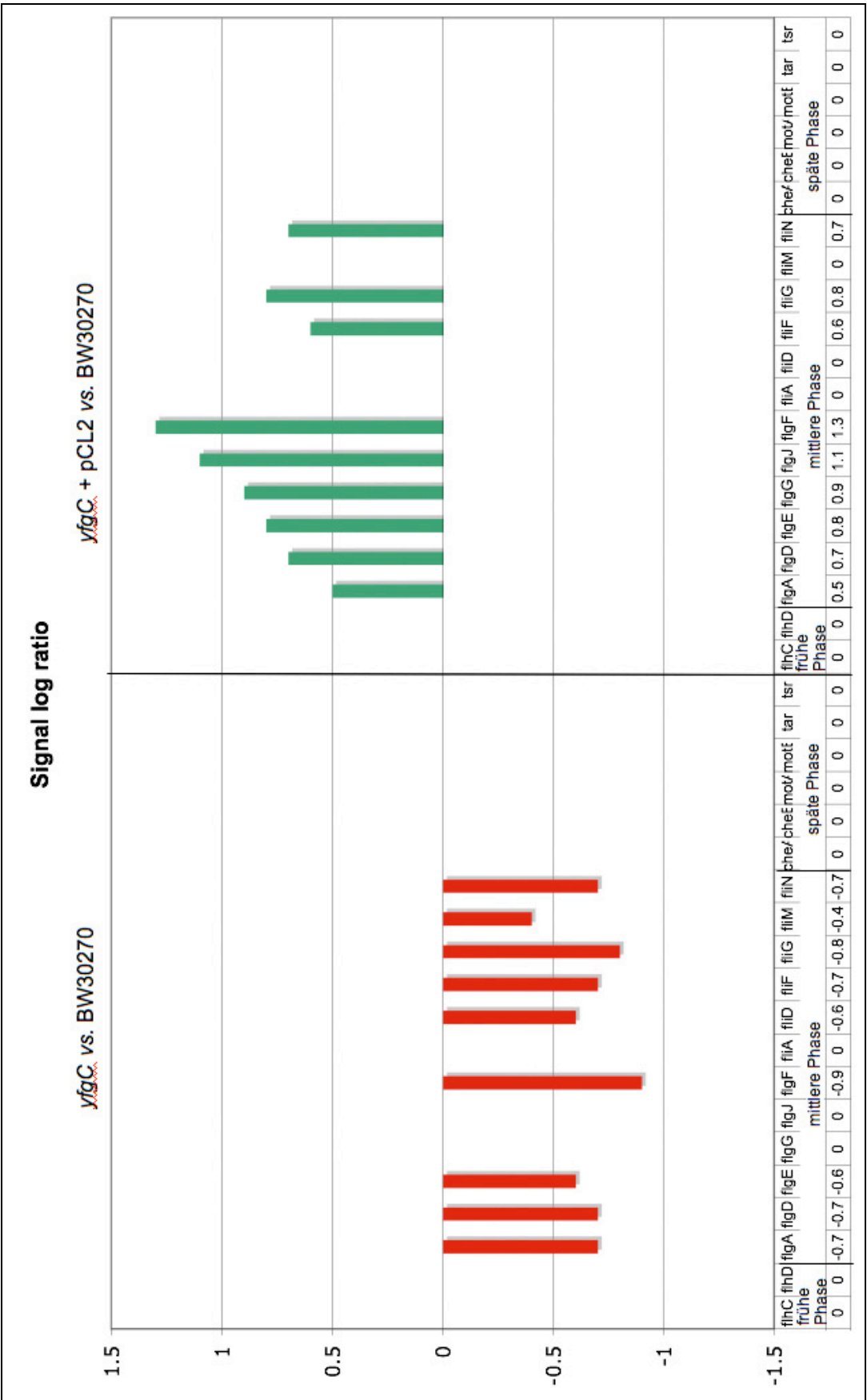


Abb. 4-54: Genexpression in dem *yfgC* Deletionsstamm und *yfgC* Deletionsstamm + pCL2. Dargestellt ist der signal log ratio der Gene der frühen, mittleren und späten Phase der Flagellensynthese. Erhöhte Regulationen sind in grün, niedrige in rot dargestellt

4.3.1 qRT-PCR

Zur Verifizierung der Genomearray-Daten wurde stichprobenartig die relative Expression einiger Gene mittels qRT-PCR (3.2.1.8) überprüft. Die Anzucht der Kulturen erfolgte unter den gleichen Bedingungen, die für die Genomearrays gewählt wurden (3.2.1.9). Die anschließende RNA-Präparation und cDNA-Synthese wurde wie unter 3.2.1.6 und 3.2.1.7 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach Pfaffl (3.2.1.8). Überprüft wurden nur die Stämme, in denen die Genregulationen auffällig waren, und die Wildtypstämme mit und ohne Leervektor pCS19 zur Kontrolle. Zusätzlich wurde noch die inaktive Mutante von YggG mitgeführt.

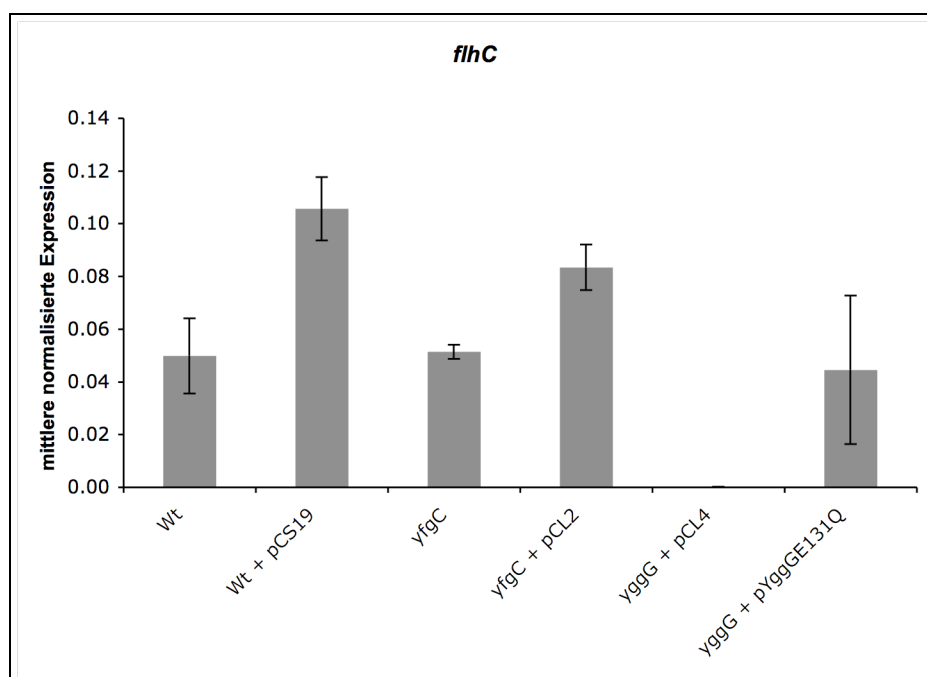


Abb. 4-55: Relative Expression von *flhC* (Gen aus der frühen Phase der Flagellensynthese). Die Ergebnisse der qRT-PCR liefern die mittlere normalisierte Expression von *flhC* in dem *yfgC* und *yggG* Deletionsstamm, den komplementierten Stämmen sowie in dem Wildtyp BW30270 bzw. BW30270 + pCS19. Angegeben sind der relevante Genotyp und das Plasmid/Vektor. Die Standardabweichung ist das Resultat aus drei Messungen. Die Kulturen wurden in Minimalmedium (M9) + 0,4% Glucose bei 37°C inkubiert. Zusatz für Stämme mit Plasmid: 200 µg/ml Ampicillin, 50 µg IPTG.

Die Daten der qRT-PCR für die Expression von *flhC* belegen größtenteils die Ergebnisse des Genomearrays. Im *yfgC* Stamm ist im Vergleich zum Wildtyp kein Unterschied in der Regulation zu erkennen. Ein nicht signifikanter Unterschied zeigt sich zwischen dem Wildtyp mit pCS19 und dem *yfgC* Stamm mit pCS19. Auffällig ist, dass im *yggG* Stamm mit aktivem YggG keine Expression von *flhC* vorhanden ist. Dies stimmt mit den Daten der Genomearrays überein. Der Stamm mit der inaktiven YggG-Variante zeigt hingegen eine Expression des Gens.

Die relative Expression von *flhD* ist im Wildtypstamm, im *yfgC* Deletionsstamm sowie im *yggG* Deletionsstamm mit der inaktiven Mutante von YggG gleich stark (Abb. 4-56). Die Expression im Wildtyp mit Leervektor und *yfgC* Deletionsstamm mit pCL2 ist gegenüber den zuvor erwähnten Stämmen leicht erhöht, wobei die des komplementierten *yfgC* Stamms minimal höher ist. Dies ist aber aufgrund der internen Schwankungen der RNA-Präparationen und der Standardabweichung vernachlässigbar. Der *yggG* Deletionsstamm mit pCL4 zeigt, dass die Expression von *flhD* vollständig herunterreguliert ist. Somit stimmen die relativen Expressionen von *flhD* mit den Regulationen der Genomearrays überein.

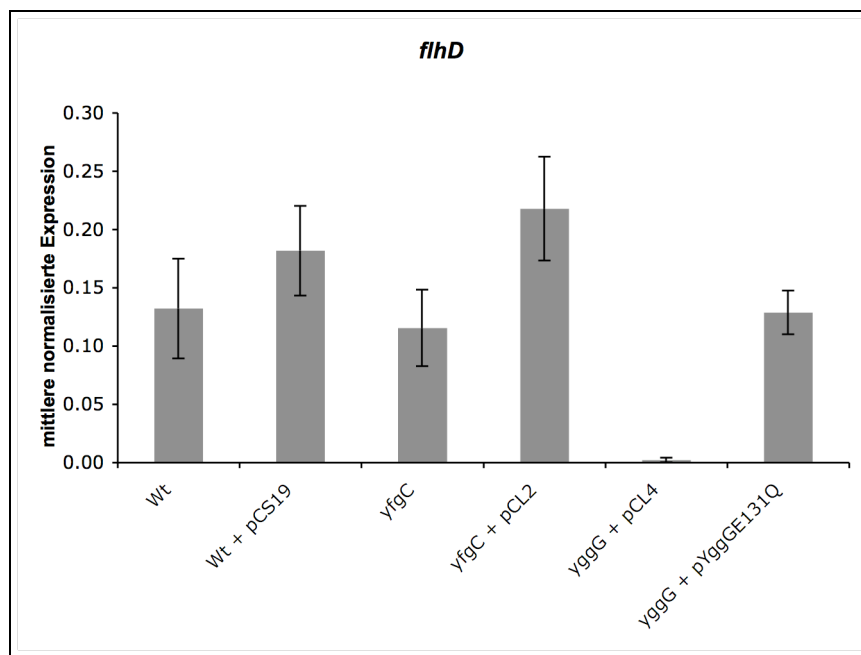


Abb. 4-56: Relative Expression von *flhD* (Gen aus der frühen Phase der Flagellensynthese). Die Ergebnisse der qRT-PCR liefern die mittlere normalisierte Expression von *flhD* in dem *yfgC* und *yggG* Deletionsstamm, den komplementierten Stämmen sowie in dem Wildtyp BW30270 bzw. BW30270 + pCS19. Angegeben sind der relevante Genotyp und das Plasmid/Vektor. Die Standardabweichung ist das Resultat aus drei Messungen. Die Kulturen wurden in Minimalmedium (M9) + 0,4% Glucose bei 37°C inkubiert. Zusatz für Stämme mit Plasmid: 200 µg/ml Ampicillin, 50 µg IPTG.

Die relative Expression von *fliD* (Abb. 4-57) entspricht der Regulation in den Genomearrays. Im *yfgC* Deletionsstamm mit pCL2 ist kein Unterschied zu der *fliD*-Expression des Wildtyps + Leervektor (pCS19) zu erkennen. Die Expression von *fliD* im *yfgC* Knockoutstamm ist um den Faktor 0,5 niedriger als im Wildtypstamm. Diese Regulation zeigt sich auch in den Genomearrays mit dem Faktor -0,6 (Abb. 4-54). Die *fliD*-Expression im *yggG* Deletionsstamm mit pCL4 ist vollständig herunterreguliert, was den Daten in Abb. 4-53 entspricht. Dagegen wird *fliD* im *yggG* Deletionstamm mit der inaktiven Mutante von YggG noch exprimiert, wenn auch geringer als im Wildtypstamm.

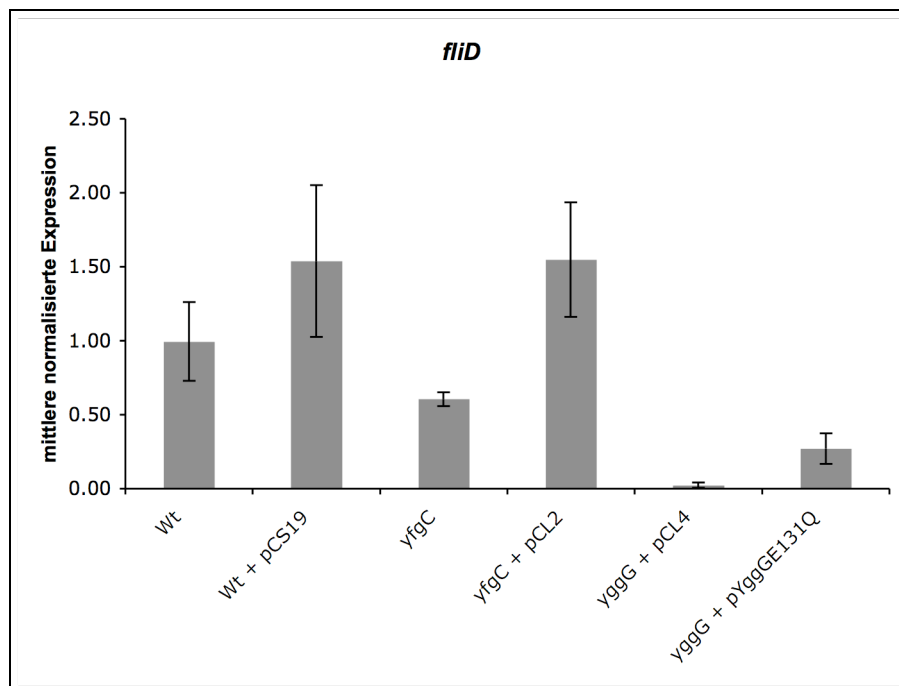


Abb. 4-57: Relative Expression von *fliD* (Gen aus der mittleren Phase der Flagellensynthese). Die Ergebnisse der qRT-PCR liefern die mittlere normalisierte Expression von *fliD* in dem *yfgC* und *yggG* Deletionsstamm, den komplementierten Stämmen sowie in dem Wildtyp BW30270 bzw. BW30270 + pCS19. Angegeben sind der relevante Genotyp und das Plasmid/Vektor. Die Standardabweichung ist das Resultat aus drei Messungen. Die Kulturen wurden in Minimalmedium (M9) + 0,4% Glucose bei 37°C inkubiert. Zusatz für Stämme mit Plasmid: 200 µg/ml Ampicillin, 50 µg IPTG.

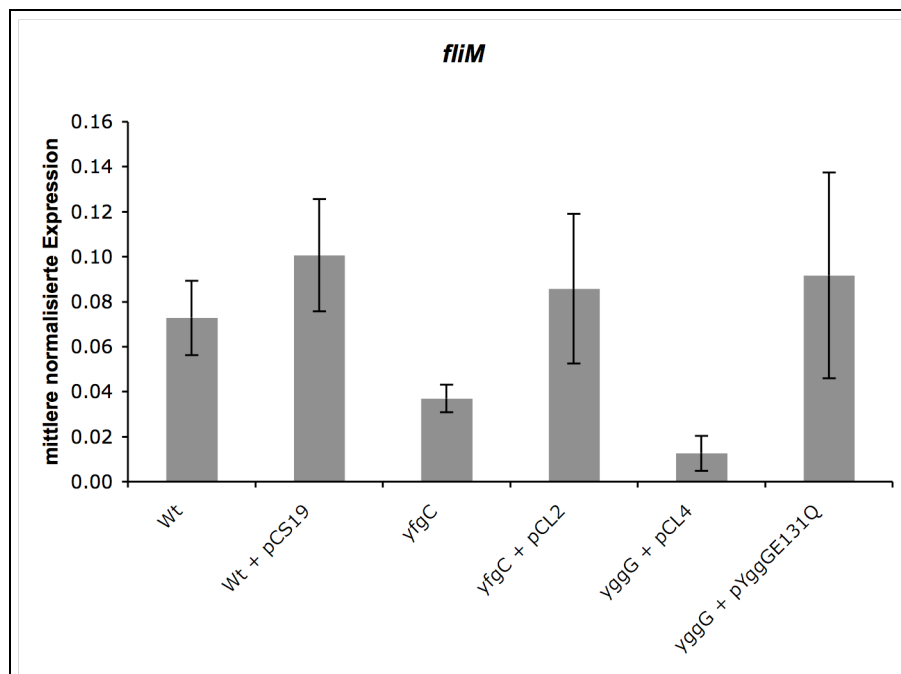


Abb. 4-58: Relative Expression von *fliM* (Gen aus der mittleren Phase der Flagellensynthese). Die Ergebnisse der qRT-PCR liefern die mittlere normalisierte Expression von *fliM* in dem *yfgC* und *yggG* Deletionsstamm, den komplementierten Stämmen sowie in dem Wildtyp BW30270 bzw. BW30270 + pCS19. Angegeben sind der relevante Genotyp und das Plasmid/Vektor. Die Standardabweichung ist das Resultat aus drei Messungen. Die Kulturen wurden in Minimalmedium (M9) + 0,4% Glucose bei 37°C inkubiert. Zusatz für Stämme mit Plasmid: 200 µg/ml Ampicillin, 50 µg IPTG.

Im *yfgC* Stamm ist die relative Expression von *flhM* im Vergleich zum Wildtypstamm leicht herunterreguliert (Abb. 4-58). Dies entspricht den Ergebnissen des Genomearrays, in dem die Expression genau wie hier um den Faktor 0,4 reduziert ist (Abb. 4-54). Ein nicht signifikanter Unterschied zeigt sich zwischen dem Wildtyp mit pCS19 und dem *yfgC* Deletionsstamm. Im *yggG* Stamm mit aktivem YggG zeigt sich eine stark verminderte Expression von *flhM*, welche sich auch in den Genomearrays widerspiegelt. Der Stamm mit der inaktiven YggG-Variante zeigt hingegen eine erhöhte Expression des Gens. Dies stimmt mit den Regulationen von *flhC* und *flhD* überein. Auch dabei zeigte der Stamm mit dem inaktiven YggG eine Expression, während der Stamm mit der aktiven Form diese nicht aufwies.

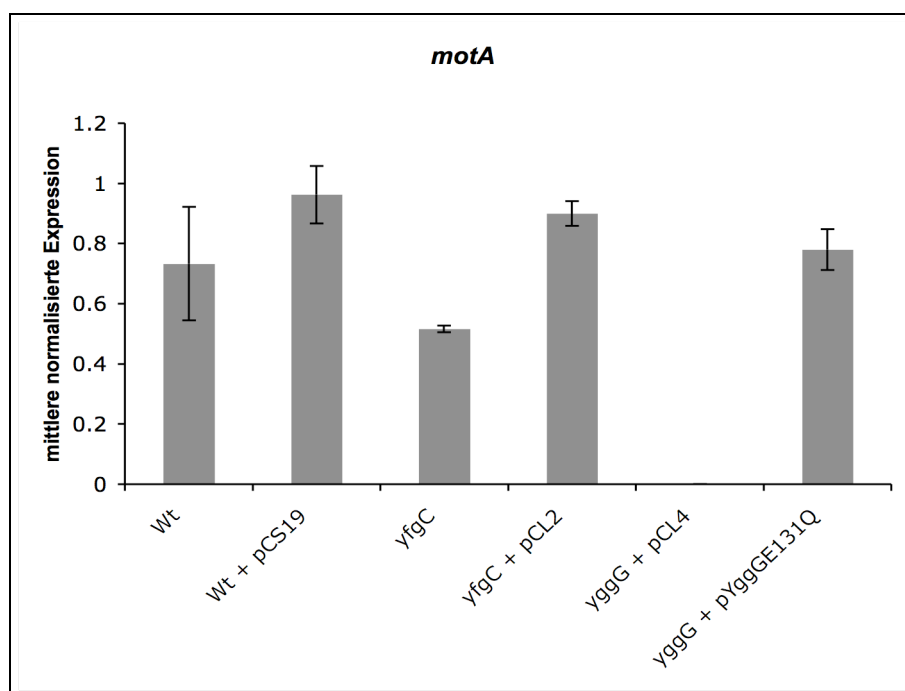


Abb. 4-59: Relative Expression von *motA* (Gen aus der späten Phase der Flagellensynthese). Die Ergebnisse der qRT-PCR liefern die mittlere normalisierte Expression von *motA* in dem *yfgC* und *yggG* Deletionsstamm, den komplementierten Stämmen sowie in dem Wildtyp BW30270 bzw. BW30270 + pCS19. Angegeben sind der relevante Genotyp und das Plasmid/Vektor. Die Standardabweichung ist das Resultat aus drei Messungen. Die Kulturen wurden in Minimalmedium (M9) + 0,4% Glucose bei 37°C inkubiert. Zusatz für Stämme mit Plasmid: 200 µg/ml Ampicillin, 50 µg IPTG.

Die Daten der qRT-PCR für die *motA*-Expression (Abb. 4-59) zeigen weitestgehend Übereinstimmungen zu den Ergebnissen des Genomearrays. Im *yfgC* Deletionsstamm mit pCL2 ist kein Unterschied zu der *motA*-Expression des Wildtyps + Leervektor (pCS19) sichtbar. Ein nicht signifikanter Unterschied zeigt sich zwischen dem Wildtypstamm und dem *yfgC* Deletionsstamm. Die *motA*-Expression im *yggG* Deletionsstamm mit pCL4 ist vollständig herunter reguliert, dies entspricht den Daten in Abb. 4-53. Dagegen wird *motA* im *yggG* Deletionsstamm mit inaktivem YggG noch genauso stark wie im Wildtypstamm exprimiert.

4.3.2 Stichagartest

Zur funktionellen Analyse der Ergebnisse des Genomearrays und der qRT-PCR wurden für den komplementierten *yggG* Deletionsstamm und den Knockoutstamm Stichagartests zur Motilitätsuntersuchung durchgeführt. In diesen beiden Stämmen zeigte die Expression der Gene aus der Flagellensynthese die stärkste Regulation. Die Kulturen wurden unter denselben Bedingungen wie für die Genomearrays angezogen. Die Durchführung des Stichagartests erfolgte wie unter 3.2.2.4 beschrieben.

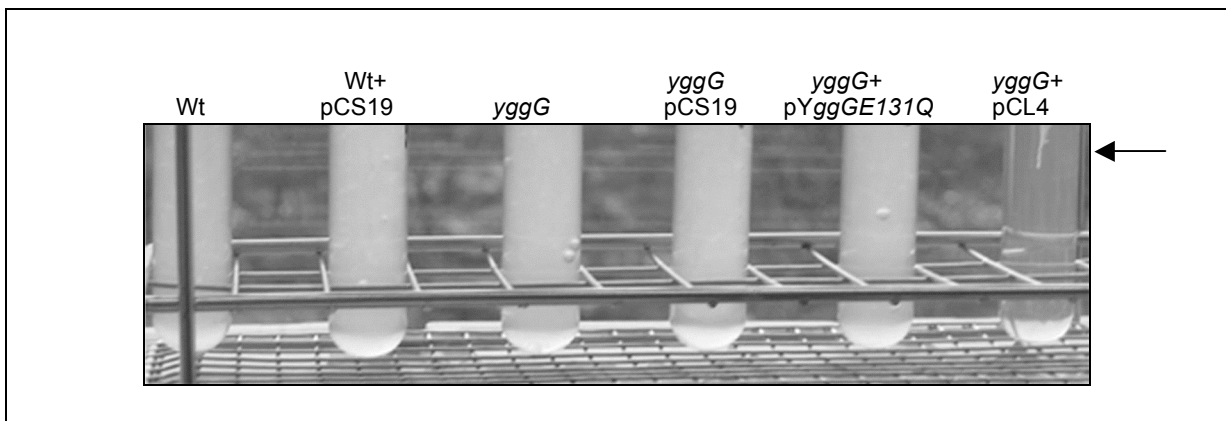


Abb. 4-60: Stichagartest. Durchgeführt wurde der Test mit dem Wildtyp BW30270 (Wt) und dem *yggG* Deletionsstamm allein und transformiert mit Leervektor (pCS19) und dem inaktiven (pYggGE131Q) und dem aktiven (pCL4) YggG. Mit dem Pfeil markiert ist die Impfstelle des *yggG* Stamms + pCL4, bei der sich die Bakterien nicht fortbewegt haben. Zusatz für Stämme mit Plasmid: 200 µg/ml Ampicillin, 50 µg IPTG. Die Kulturröhrchen wurden über Nacht bei 30°C inkubiert.

Die Ergebnisse des Stichagartests (Abb. 4-60) belegen die vorherigen Daten aus den Genomearrays (4.2.6) und qRT-PCR (4.2.7). Der Wildtypstamm mit und ohne den Leervektor pCS19 dient als Kontrolle. Die Trübung zeigt, dass sich die Bakterien im Agar fortbewegen können. Der *yggG* Deletionsstamm mit und ohne pCS19, sowie mit der inaktiven Mutante von YggG (pYggGE131Q) ist ebenfalls motil wie die Trübung des Stichagars erkennen lässt. Der einzige Stamm, der sich nicht in dem Agar fortbewegen kann, ist der mit dem aktiven *yggG* komplementierte Knockoutstamm. Hier zeigt sich nur im Bereich der Impfstelle (Pfeil in Abb. 4-60) ein Zellwachstum, was darauf hinweist, dass den Bakterien die Flagellen zur Fortbewegung fehlen.

4.3.3 Schwärmassays

Zur Verifizierung der Ergebnisse des Stichagartests und weiteren Analyse der Fortbewegung durch Flagellen wurden Schwärmassays durchgeführt. Hierbei ist es möglich den Schwärmradius der Bakterien zu ermitteln. Die Kulturen wurden unter denselben Bedingungen wie für die Genomearrays angezogen und die Induktion von YggG mittels Western Blot kontrolliert (Abb. 4-62). Die Durchführung der Schwärmassays erfolgte wie unter 3.2.2.5 beschrieben.

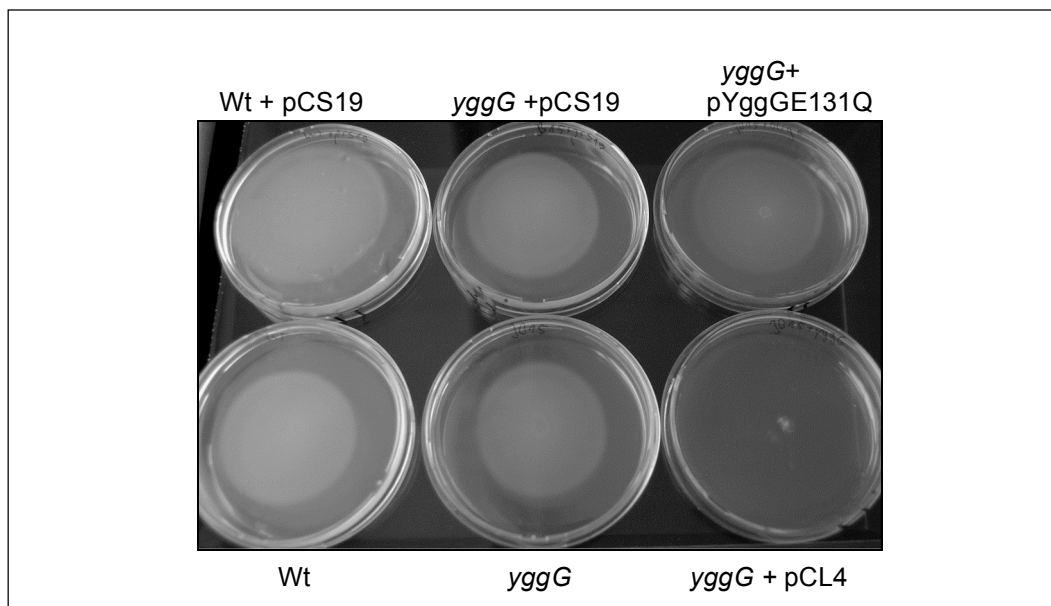


Abb. 4-61: Schwärmsassay. Durchgeführt wurde der Assay mit dem Wildtyp BW30270 (Wt) und dem *yggG* Deletionsstamm allein und transformiert mit Leervektor (pCS19) und dem inaktiven (pYggGE131Q) und dem aktiven (pCL4) YggG. Zusatz für Stämme mit Plasmid: 200 µg/ml Ampicillin, 50 µg IPTG. Die Platten des Schwärmassays wurden über Nacht bei 30°C inkubiert.

Die Schwärmassays (Abb. 4-61) zeigen, dass die Schwärmeigenschaften des *yggG*-Deletionsstamms ohne Plasmid, mit pCS19 und mit der inaktiven Mutante von YggG dem Wildtypstamms BW30270 entsprechen. Eine Ausnahme bildet, wie bereits im Stichagartest, der komplementierte Knockoutstamm mit der aktiven Form von YggG. Das Wachstum konzentriert sich hier nur auf die Impfstelle im Zentrum der Platte. Somit besitzen diese Bakterien, wie erwartet, keinerlei Schwärmeigenschaften.

Die Schwärmassays wurden auch für den *yfgC* Deletionsstamm mit und ohne Vektor, sowie mit aktiver und inaktiver YfgC-Variante komplementiert, durchgeführt. Die Schwärmassays erfolgten wie oben beschrieben. Die Ergebnisse dieser und der in Abb. 4-61 dargestellten Versuche sind in Durchmessern in Tab. 4-6 aufgeführt. Der *yfgC* Deletionsstamm sowie

seine komplementierten Varianten zeigen keine signifikanten Veränderungen im Schwärmverhalten im Vergleich zum Wildtypstamm.

Stamm/Genotyp	Vektor/Plasmid	Durchmesser in cm
BW30270	-	7
BW30270	pCS19	7,7
<i>yfgC</i>	-	7,8
<i>yfgC</i>	pCS19	6,5
<i>yfgC</i>	pCL2	6,5
<i>yfgC</i>	pYfgCE137Q	6
<i>yggG</i>	-	6,5
<i>yggG</i>	pCS19	7
<i>yggG</i>	pCL4	0
<i>yggG</i>	pYggGE131Q	6,5

Tab. 4-6: Ergebnisse der Schwärmassays in cm

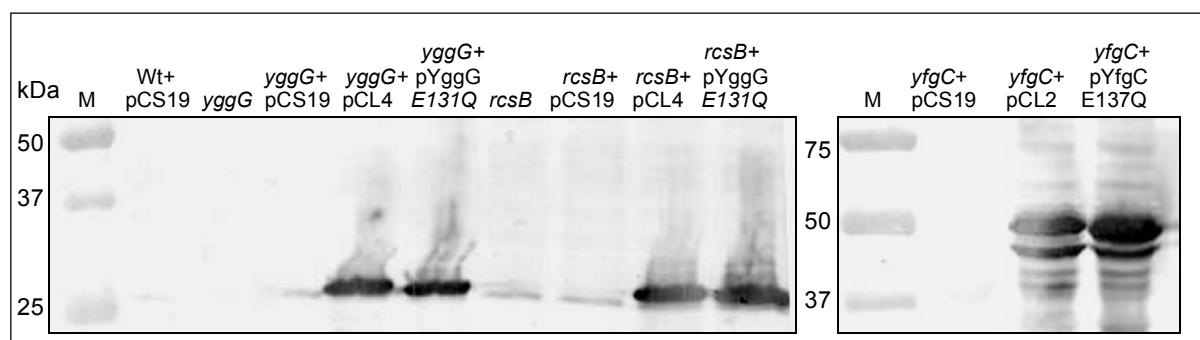


Abb. 4-62: Western Blot zur Kontrolle der Induktion. Der Western Blot zeigt die Induktion von YggG (ca. 25 kDa) und YfgC (50 kDa) aller in den Schwärmassays eingesetzten Stämme. Als Kontrollen wurden der Wildtyp BW30270 (Wt) und die Deletionsstämme mit und ohne Leervektor aufgetragen. YfgC zeigt unterhalb von 50 kDa einen leichten Abbau. Die YggG und YfgC Antikörper wurden 1:20000 eingesetzt. Angegeben ist der relevante Genotyp und das enthaltene Plasmid/Vektor; M: Marker

Der Western Blot belegt, dass die Induktion in den Kulturen mit Plasmid erfolgreich war. Somit existierten in den Schwärmassays die gleichen Bedingungen wie in den Genomearrays. Somit zeigen die Ergebnisse der Motilitätsuntersuchungen die Phänotypen, welche durch die erhöhte Expression von YggG entstehen.

Um die Ursachen für das nicht vorhandene Schwärmen des *yggG* Stamms + pCL4 zu ermitteln, wurden Literaturrecherchen durchgeführt. Diese ergaben, dass die Expression der Initiatoren der Flagellensynthese *flhC* und *flhD* durch viele unterschiedliche Regulatoren kontrolliert werden. Zu den negativen Regulatoren gehörte u.a. RcsB (Wang *et al*, 2007). Aktiviert wird der Rcs-Weg durch Stress in der Zellhülle z.B. hervorgerufen durch Antibiotika (Laubacher und Ades, 2008). Da das Außenmembranprotein YggG vermutlich ebenfalls in diese Stressprozesse involviert ist und ein Regulon des Rcs-Wegs darstellt, könnte ein Zusammenhang bestehen. Um diesen zu erforschen wurden Schwärmassays unter den

bereits erwähnten Bedingungen in *rscB* Deletionsstämmen durchgeführt. Dafür wurde der *rscB* Stamm mit pCS19, pCL4 und pYggGE131Q transformiert und die Kulturen wie für die Genomearrays angezogen.

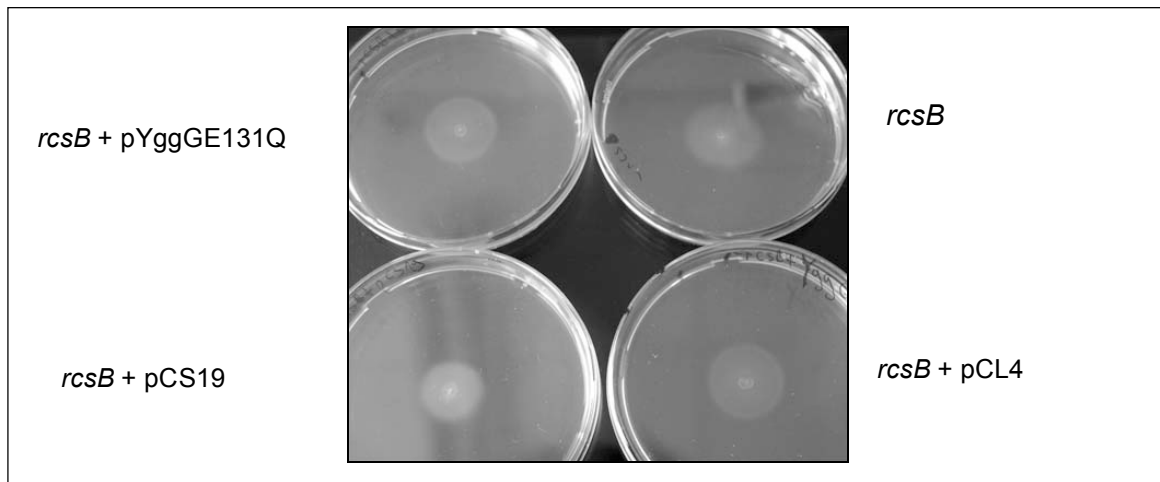


Abb. 4-63: Schwärmsassay im *rscB* Deletionsstamm. Durchgeführt wurde der Schwärmsassay mit dem *rscB* Deletionsstamm allein und transformiert mit Leervektor (pCS19) und dem inaktiven (pYggGE131Q) und dem aktiven (pCL4) YggG. Zusatz für Stämme mit Plasmid: 200 µg/ml Ampicillin, 50 µg IPTG. Die Platten des Schwärmsassays wurden über Nacht bei 30°C inkubiert.

Die Abb. 4-63 zeigt, dass die Bakterien des *rscB* Stamm insgesamt nicht so gut schwärmen wie die des Wildtypstamms (Abb. 4-61). Der Radius der schwärmenden Zellen ist insgesamt kleiner. Jedoch zeigt sich, dass auch der *rscB* Stamm mit pCL4 schwärmt. Er unterscheidet sich im Schwärmverhalten nicht zu dem *rscB* Deletionsstamm. Der Western Blot (Abb. 4-62) zeigt, dass die Induktion erfolgreich war und *yggG* genau wie in den Genomearrays exprimiert wurde. Das aktive YggG besitzt im *rscB* Knockoutstamm also nur verminderten oder keinen Einfluss auf die Flagellensynthese. Wodurch sich die Annahme, dass YggG die Flagellensynthese direkt oder indirekt über den Rcs-Weg beeinflusst, bestätigt.

5. Diskussion

5.1 Charakterisierung von YfgC und YggG, putative Metalloproteasen in der Zellhülle von *E. coli*

Die Proteinzusammensetzung von *E. coli* lässt sich von der Genomsequenz ableiten (Blattner *et al.*, 1997). So befinden sich über Zweidrittel der Proteine im Cytoplasma, ca. 20% sind in der Cytoplasmamembran und nur ca. 10% in der Zellhülle von *E. coli*. Dabei existieren in *E. coli* auch Proteine, die bisher noch nicht charakterisiert sind und über die es nur Hinweise aus Computervorhersagen gibt. Ein Teil dieser uncharakterisierten Proteine befindet sich in der Zellhülle, wobei deren Lokalisation und Funktion nur auf Annahmen aus Sequenzvergleichen beruht. So besitzen die uncharakterisierten Proteine YfgC und YggG vermutlich Proteasefunktionen. Anhand der Aminosäuresequenzen können YfgC und YggG den Metalloproteasen zugeordnet werden. Sie besitzen das HEXXH-Motiv, welches in den Metalloproteasen der Familie M48 (1.8.4) vorkommt. Die Proteasen dieser Familie wie z.B. HtpX (1.10) und Oma1 (1.9) sind oft in die Proteinqualitätskontrolle involviert. So ließ das Vorhandensein des HEXXH Motiv vermuten, dass auch YfgC und YggG an der Proteinqualitätskontrolle in *E. coli* beteiligt sind. Um diesem Hinweis nachzugehen wurden Experimente zur Substratsuche *in vitro* und *in vivo* durchgeführt. Zudem ergab sich die Fragestellung der Lokalisation der Proteine, die für YfgC und YggG laut Signalsequenz- und Topologievorhersagen unterschiedlich sind. Zur Aufklärung dieser Vorhersagen wurden weiterführende Untersuchungen vorgenommen. Außerdem wurden erste *in vitro* Charakterisierungen zur Analyse der Struktureigenschaften dieser Proteine durchgeführt.

5.2 Die Metalloprotease YfgC

5.2.1 YfgC ist ein periplasmatisches Protein mit potentieller Protease- und Chaperonfunktion

YfgC besitzt ein katalytisch wirksames Zink im aktiven Zentrum, welches durch das HEXXH-Binde-Motiv koordiniert wird (1.11). Dies ist charakteristisch für Metalloproteasen der Familie M48. Zu dieser Gattung der Metalloproteasen gehören vor allem Transmembranpeptidasen. Auch YfgC soll laut bioinformatischen Vorhersagen der Datenbanken Transmembrandomänen besitzen. So wird z.B. von den `Transmembran Prediction Servern` DAS (URL: <http://www.sbc.su.se>) und TMPred (URL: <http://www.ch.embnet.org>) prognostiziert, dass YfgC drei Transmembrandomänen besitzt. Nach Berechnungen der Datenbanken TMHMM (URL: www.cbs.dtu.dk) und SOSUI (URL: bp.nuap.nagoya-u.ac.jp),

sowie nach Vorhersagen von EchoBase und EcoGene (URL: www.prfect.org) besitzt YfgC keine Transmembrandomänen, sondern ist ein lösliches periplasmatisches Protein. Um diese Vorhersagen zu untersuchen und die tatsächliche Lokalisation von YfgC aufzuklären, wurden periplasmatischer Extrakt und Membranfraktionen des Wildtyps BW30270 analysiert. YfgC wurde in den unterschiedlichen Fraktionen mittels Western Blot und anschließender Immundetektion nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass YfgC ein lösliches periplasmatisches Protein ist, das keine Transmembrandomänen besitzt (4.1.3.1). Dieses Ergebnis ließ sich durch die problemlose Reinigung des Proteins mit Original-Signalsequenz, ohne zusätzliche Detergenzien, untermauern. Anhand dieser Daten stellt sich die Frage, ob YfgC ein klassisches Protein der Familie M48 ist, da diese Gruppe hauptsächlich Transmembranproteasen beinhaltet. So kann YfgC nur anhand des Binde-Motivs dieser Familie zugeordnet werden und bildet ansonsten eine Ausnahme zu den anderen Vertretern der M48-Gruppe.

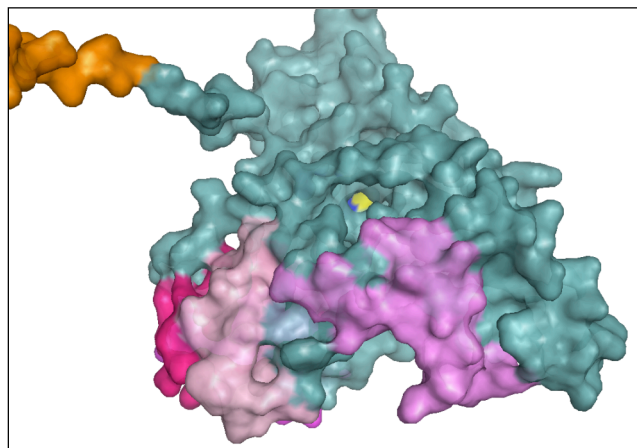


Abb. 5-1: YfgC-Modell dargestellt mit PyMol. Das aktive Zentrum ist in gelb und drei der vier TPR-Domänen sind in pink, rose und violett dargestellt.

YfgC stellt eine potentielle Protease dar, deshalb wurde in *in vitro* Experimenten eine Reihe von unterschiedlichen Substraten getestet (4.1.2.2). Keines der eingesetzten Substrate wurde dabei von YfgC abgebaut. Die Betrachtung des Modells der YfgC-Struktur (Abb. 5-1) liefert einen möglichen Hinweis dafür. Das Modell zeigt, dass der Zugang zum aktiven Zentrum sehr eng ist und möglicherweise durch die TPR-Domänen (Abb. 5-1) reguliert wird. Diese sind für Protein-Protein-Interaktionen zuständig und könnten eine ähnliche Funktion wie PDZ-Domänen besitzen. So binden z.B. die PDZ-Domänen von DegP den C-Terminus des Substrats und leiten dieses an das aktive Zentrum weiter. DegP besitzt zwei PDZ-Domänen, als Protease und Chaperon übernimmt es eine wichtige Rolle in der Proteinqualitätskontrolle. Die PDZ1-Domäne bindet dabei Substrate und dadurch wechselt DegP vom ruhenden in den aktiven Zustand (Krojer *et al.*, 2008). Die TPR-Domänen in YfgC könnten ebenfalls in dieser Form agieren und somit die Aktivität von YfgC direkt oder

indirekt beeinflussen. Während DegP jedoch viele Substrate *in vitro* abbaut, zeigt sich dies nicht für YfgC (4.1.2.2). Grund dafür kann, neben dem schwer zugänglichen aktiven Zentrum, auch das umgebende Milieu sein. So entsteht vermutlich nur unter bestimmten Salz- und pH-Bedingungen und in Gegenwart eines spezifischen Substrats eine Konformationsänderung innerhalb von YfgC, welche die Wechselwirkung mit den TPR-Domänen bzw. den Zugang zum aktiven Zentrum ermöglicht.

Außerdem ergaben die Untersuchungen des Oligomerisierungszustandes zwar, dass YfgC *in vitro* ohne Substrat als Monomer vorliegt (4.1.2.1), jedoch ist nicht sicher, dass dieser Oligomerisierungszustand auch *in vivo* vorkommt. So ist es theoretisch möglich, dass YfgC im Periplasma und in Gegenwart eines Substrats auch höhere oligomere Zustände annimmt, wie dies auch für DegP in Anwesenheit eines Substrats beobachtet wurde (Merdanovic *et al.*, 2010). Offensichtlich waren die bisher eingesetzten Bedingungen (getestete Puffer und Substrate) zur *in vitro* Charakterisierung von YfgC nicht optimal, weshalb weitere Untersuchungen *in vivo* durchgeführt wurden.

5.2.2 Die Beteiligung von YfgC in der Biogenese von Außenmembranproteinen

Die Untersuchungen von Deletions- und Doppeldeletionsstämmen *in vivo* zeigten Auffälligkeiten im *surA yfgC* Doppelknockoutstamm. Bei 42°C wies dieser Stamm ein deutlich reduziertes Wachstum im Vergleich zu den jeweiligen Einzeldelentionsstämmen auf (4.1.3.3). Dies lieferte den ersten Hinweis, dass SurA und YfgC unter Stressbedingungen, wie sie durch erhöhte Temperaturen entstehen, möglicherweise redundante Funktionen ausüben. Komplementationassays mit SurA und YfgC zeigten, dass SurA das Wachstumsdefizit bei 42°C ausgleicht. Wird der *surA yfgC* Deletionsstamm mit der aktiven oder der inaktiven (YfgCE137Q) Form von YfgC transformiert, ist ebenfalls eine Verbesserung des Wachstums zu erkennen. Dabei komplementiert YfgCE137Q den Phänotyp genauso gut wie das YfgC mit Proteasefunktion. Hieraus lässt sich schließen, dass die Proteasefunktion nicht ausschlaggebend für das Wachstum der Bakterienzelle ist. YfgC besitzt möglicherweise eine Chaperonfunktion, welche hierbei eine wichtigere Aufgabe übernimmt. Diese Schlussfolgerung erscheint sinnvoll da SurA ebenfalls als Chaperon fungiert (Missiakas *et al.*, 1996) und YfgC somit unter bestimmten Bedingungen Aufgaben von SurA übernehmen kann.

Zudem konnte gezeigt werden, dass SurA und YfgC unter bestimmten Bedingungen essentiell sind. So ist der *surA yfgC* Doppelknockoutstamm bei 42°C und hoher Osmolarität synthetisch letal (Dissertation, J.Weski). Diese Beobachtung zeigte sich nicht in den Einzeldelentionsstämmen, wodurch die Relevanz der Kombination beider Gene bestätigt wird. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass SurA und YfgC in denselben

Prozessen agieren und möglicherweise dieselben Substrate besitzen. SurA ist eine Prolinisomerase mit Chaperonfunktion, welche so wie YfgC löslich im Periplasma vorliegt. Da SurA in der korrekten Faltung und Assemblierung von Außenmembranproteinen involviert ist (Lazar und Kolter, 1996; Rouviere und Gross, 1996; Behrens *et al.*, 2001; Bitto und McKay, 2003), wurde auch die Rolle von YfgC in diesen Prozessen untersucht. Substrate von SurA sind die Außenmembranproteine LamB und LptD (Ureta *et al.*, 2007; Vertommen *et al.*, 2009). Untersuchungen von Doppeldeltionsstämmen, in diesem Fall der *degP yfgC* KO (4.1.3.5), lieferten erste Hinweise, dass LamB auch ein Substrat von YfgC darstellen könnte. LamB ist ein Porin, das in den Maltosetransport involviert ist (Klebba *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1997). In der Außenmembran liegt es als Trimer vor, die Assemblierung zum trimeren Oligomerisierungszustand verläuft über mehrere Zwischenstufen. Im ersten Schritt erfolgt die Abspaltung der Signalsequenz vom Vorläuferprotein. Im zweiten Schritt wird das ungefaltete, reife LamB (49 kDa) in ein gefaltetes Monomer (30 kDa) umgewandelt. Der dritte Schritt führt letztendlich zur Ausbildung des Trimers (80 kDa). Der Nachweis eines erhöhten Anteils von reifem, ungefaltetem LamB im Zellextrakt ist ein Indiz dafür, dass LamB nicht mehr richtig gefaltet oder abgebaut werden kann. Ein erhöhter Gehalt an ungefaltetem, reifem LamB, zeigte sich bei den Untersuchungen auch im *degP yfgC* Deletionsstamm. Der Anteil in den Einzeldeltionsstämmen, war hingegen schwächer oder nicht vorhanden (4.1.3.5). Dies bedeutet, dass YfgC unter bestimmten Bedingungen ähnliche Funktionen wie DegP besitzt und der Anteil an ungefaltetem LamB zunimmt, da weder DegP noch YfgC vorhanden sind um es zu falten oder abzubauen. Somit stellt LamB ein Substrat von YfgC dar, die Überprüfung dieses Hinweises mittels Co-Immunpräzipitation bestätigt dies (4.1.3.6). Somit besitzen YfgC, SurA und DegP vor allem unter bestimmten Stressbedingungen (erhöhte Temperatur und Hochsalz) redundante Funktionen. Wenn dem Bakterium SurA (Chaperon) oder DegP (Protease und Chaperon) fehlt, kann YfgC folglich einen Teil ihrer Funktionen übernehmen. Wie Vertommen *et al.*, 2009 zeigten, ist auch das Außenmembranprotein LptD (Bos *et al.*, 2007b), ein Substrat von SurA. Die vorangegangenen Hinweise auf redundante Funktionen von SurA und YfgC auf Proteinebene, lieferten den Grund LptD als potentiell Substrat von YfgC nachzuweisen (4.1.3.7). Untersucht wurde dies, indem YfgC im *yfgC* Deletionsstamm rekombinant überexprimiert und der LptD-Gehalt anschließend durch Immundetektion ermittelt wurde. Sowohl im Ganzzellextrakt als auch in der Außenmembranfraktion zeigte sich, dass LptD in geringeren Mengen vorhanden war, wenn zeitgleich aktives YfgC überexprimiert wurde. Die Überexpression von inaktivem YfgC zeigte hingegen keinen Effekt. Somit ist der geringere LptD-Gehalt auf Proteaseaktivität von YfgC zurückzuführen. Zusätzlich wurde der mRNA-Gehalt von *lptD* in den Genomearrays (*yfgC* Stamm + pCL2) kontrolliert, hier zeigte sich keine Veränderung. Damit kann ausgeschlossen

werden, dass der geringere LptD-Gehalt auf eine verminderte Expression zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse liefern die ersten Hinweise darauf, dass LptD ein Substrat von YfgC darstellt und unterstreichen erneut, dass YfgC und SurA ähnliche Substrate besitzen. Dabei scheint im Gegensatz zum Chaperon SurA bei YfgC die Proteasefunktion relevanter zu sein. Unter welchen nativen Bedingungen LptD ein Substrat von YfgC ist, muss jedoch noch weiter analysiert werden. Dennoch kann in das Modell, welches Vertommen *et al.* für SurA, DegP und Skp erstellt haben, auch YfgC eingeordnet werden.

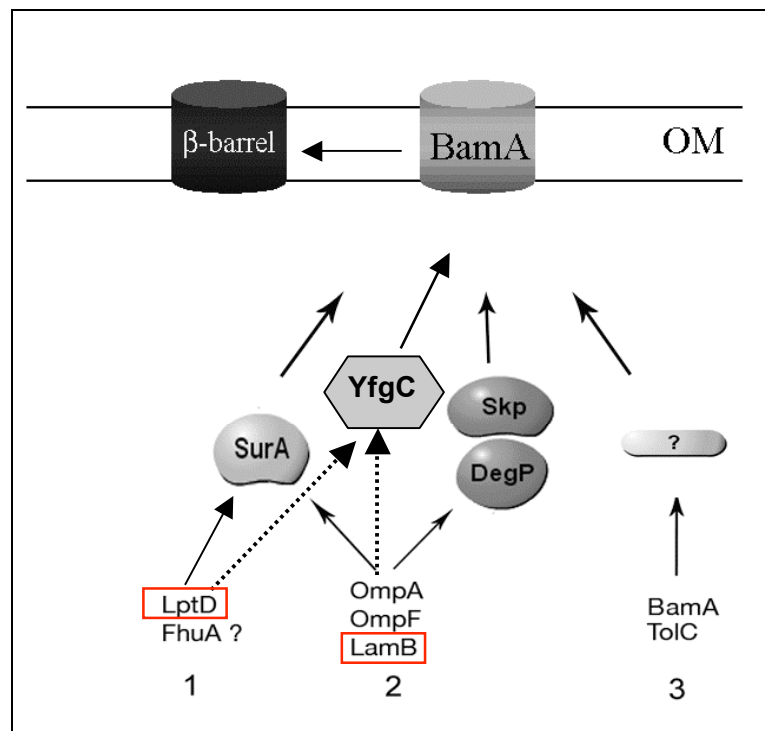


Abb. 5-2: Model für die Funktion von SurA im Periplasma (Vertommen *et al.*, 2009, modifiziert)

Außenmembranproteine werden vom Sec-Translokon (1.3) ins Periplasma transloziert, wo sie zunächst ungefaltet vorliegen. Nach Abpaltung der Signalsequenz müssen sich die Monomere falten bevor sie in die Außenmembran integrieren können. Viele Außenmembranproteine werden auf dem Weg durch das Periplasma von Chaperonen zur Außenmembran eskortiert wo die Membraninsertion durch den BAM-Komplex (1.4) unterstützt wird. Bisher sind drei Chaperone (SurA, Skp und DegP) bekannt, die an diesem Prozess beteiligt sind (Abb. 5-2). Vertommen *et al.* unterteilt die Außenmembranproteine in drei Gruppen. LptD und FhuA, die hauptsächlich von SurA abhängig sind, gehören zur Gruppe 1. Gruppe 2 beinhaltet OmpA, OmpF und LamB, die in ihrer Faltung sowohl von SurA aber auch von Skp und DegP unterstützt werden können. Gruppe 3 enthält BamA und TolC, die SurA-, DegP- und Skp-unabhängig sind (Werner *et al.*, 2003). Somit scheinen bisher noch nicht charakterisierte Faltungsfaktoren in deren Biogenese involviert zu sein.

YfgC könnte anhand der zuvor erwähnten möglichen Substrate so wie SurA zu mehr als einer der Gruppen zugewiesen werden. Wobei YfgC im Gegensatz zu SurA eine Proteasefunktion besitzt und nicht unbedingt an der Biogenese allein beteiligt ist, sondern zusätzlich auch am Abbau der fehlgefalteten Außenmembranproteinen unter Stressbedingungen. Viele andere Substrate, wie z.B. TolC und BamA, wurden noch nicht auf eine Interaktion mit YfgC untersucht. Da einige Faltungsfaktoren noch nicht identifiziert wurden, ist hier das Potential groß, dass YfgC einer dieser Unbekannten ist.

5.2.3 Stellt YfgC ein Chaperon von Lipoproteinen dar?

Um weitere native Substrate von YfgC zu ermitteln, wurden Außenmembranfraktionen massenspektrometrisch analysiert (4.1.3.8). Die Kulturen für die Außenmembranpräparationen wurden dabei unter Bedingungen angezogen, unter denen der *surA yfgC* Deletionsstamm synthetisch letal ist (42°C und hoher Osmolarität, Dissertation, J. Weski). So sollten Substrate von YfgC unter Stressbedingungen ermittelt werden. Dabei stellten sich Lipoproteine wie YedD und die Metalloprotease YggG, als potentielle Substrate heraus. Die Charakterisierung des putativen Lipoproteins YggG war ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit. Deshalb stellte sich die mögliche Interaktion zwischen YfgC und YggG als besonders interessant dar und wurde genauer untersucht. Tatsächlich deutete der Nachweis auf Proteinebene daraufhin, dass YggG unter den getesteten Bedingungen in Abwesenheit von YfgC nicht mehr in die Außenmembran integriert. Dies ist vor allem unter dem Aspekt interessant, dass die LolA-Konzentration unter diesen Bedingungen im *yfgC* Deletionsstamm gleich der im Wildtypstamm ist (4.1.3.9). LolA ist die periplasmatische Komponente des Lipoprotein-Transportweges (1.5) und somit auch für den YggG-Transport zuständig. Unter den getesteten Stressbedingungen wird YfgC vermutlich benötigt um als Chaperon Lipoproteine vor einer Fehlfaltung zu schützen und zur Außenmembran zu geleiten. Da YggG bei 37°C nicht in der Außenmembran fehlt, scheint YfgC vor allem als stressinduzierte Protease bzw. stressinduziertes Chaperon zu fungieren und relevant zu sein. Dies wird auch durch die zuvor diskutierten Ergebnisse des *surA yfgC* Deletionsstamms, der erst bei 42°C einen Phänotyp zeigt, unterstrichen. Wie die β -Galaktosidaseassays (4.1.3.2) zeigten, besitzt *yfgC* einen starken Promotor, jedoch weder bei 42°C noch bei anderen Stressbedingungen eine zusätzliche Erhöhung der Aktivität zeigte. Möglicherweise wird das Protein YfgC selbst erst durch Stress (wie z.B. 42°C und hoher Osmolarität) aktiviert. Ein denkbare Modell ist in Abb. 5-4 und Abb. 5-3 dargestellt.

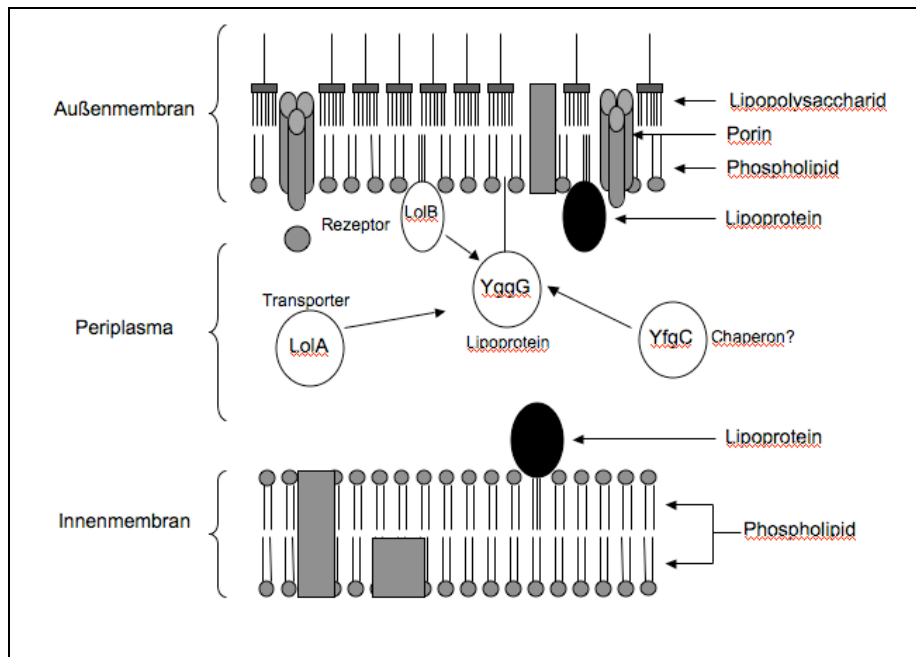


Abb. 5-3: Modell YggG Transport zur Außenmembran bei 42°C und hoher Osmolarität im Wildtypstamm

Unter den erwähnten Stressbedingungen ist die Gefahr von falsch gefalteten Proteinen erhöht. So könnte unter diesen Bedingungen auch der Transport von YggG durch LolA, erschwert sein, wodurch das YggG beschädigt zu LolB gelangt, der Komponente des Lol-Systems welche die Lipoproteine in die Außenmembran integriert. YfgC könnte in diesem Fall als unterstützendes Chaperon dienen und die richtige Faltung gewährleisten (Abb. 5-3).

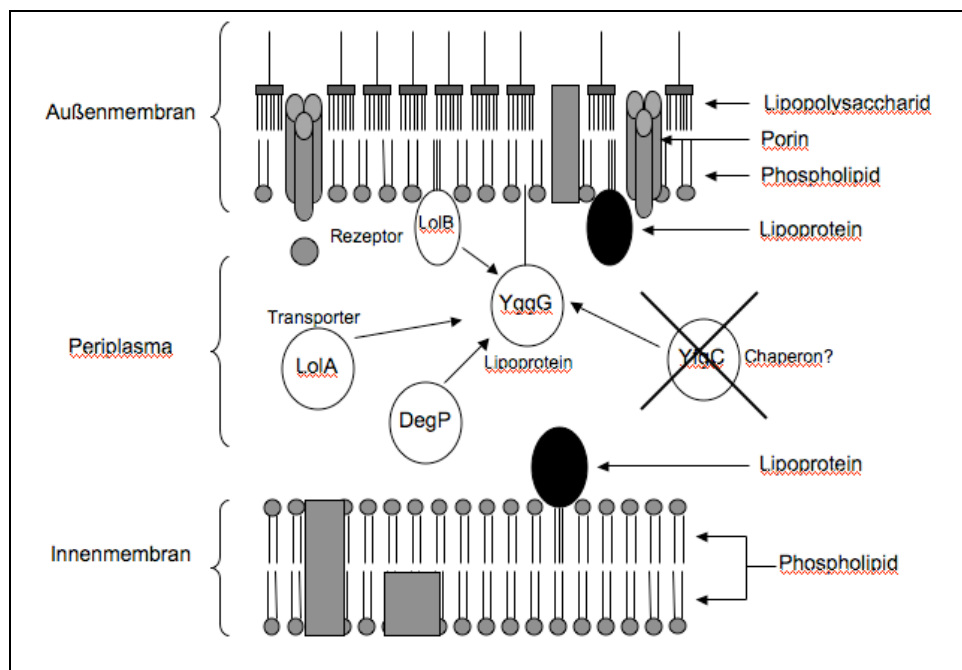


Abb. 5-4: Modell YggG Transport zur Außenmembran bei 42°C und hoher Osmolarität im *yfgC* Deletionsstamm. Als allgemeine Protease der Proteinqualitätskontrolle ist DegP dargestellt.

Fehlt YfgC hingegen, könnte das fehlgefaltete YggG durch z.B. DegP abgebaut werden und gelangt so nicht mehr in die Außenmembran (Abb. 5-4). YfgC könnte sowohl zu SurA und Skp aber auch zu LolA redundante Funktionen besitzen bzw. LolA unterstützen, so dass auch unter den erwähnten Stressbedingungen der Transport weniger essentieller Außenmembranproteine, insbesondere AM-Lipoproteinen (4.1.3.8), wie YggG (Weski, unveröffentlicht) gewährleistet ist.

Eine Interaktion zwischen YfgC und YggG zeigte sich auch bei dem chemischen 'Crosslinking' (4.1.4) sowie bei der Co-Immunpräzipitation (4.1.5), welche bei 37°C durchgeführt wurde. Somit gibt es auch unter normalen Wachstumsbedingungen eine Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen, welche noch näher charakterisiert werden muss. Vermutlich stellt YggG generell ein Substrat von YfgC dar, doch die Abhängigkeit der Metalloprotease YggG von YfgC ist erst unter hohen Stressbedingungen sichtbar. YfgC zeigte auch in den Genomearrays überschneidende Funktionen mit YggG. Während im komplementierten *yggG*-Deletionsstamm die Gene der Flagellensynthese hochreguliert sind, waren die Gene der mittleren und späten Flagellensynthese im komplementierten *yfgC*-Deletionsstamm ebenfalls hochreguliert. YggG besitzt dabei einen stärkeren Effekt, der sich im Gegensatz zu YfgC, auch in den Schwärmassays zeigte. Jedoch kann durch die Regulation auf Genebene angenommen werden, dass beide Proteine in ähnliche Prozesse direkt oder indirekt involviert sind.

5.3 Die Metalloprotease YggG

5.3.1 YggG ist ein Lipoprotein mit spezifischer Proteasefunktion

Die Signalsequenz von YggG deutet daraufhin, dass es sich um ein Lipoprotein mit Lokalisation in der Außenmembran handelt. Dies wurde durch die Untersuchung des YggG-Gehalts in den verschiedenen Zellkompartimenten bestätigt (4.2.5.1). In diesen konnte YggG eindeutig in der Außenmembran nachgewiesen werden. Als Metalloprotease mit dem HEXXH-Binde-Motiv kann es demnach sehr gut den membrangebundenen Proteasen der Familie M48 zugeordnet werden. YggG zeigte sich in den *in vitro* Analysen als spezifische Protease, da es von den getesteten Substraten nur α -Casein abbaute (4.2.3.4). Den Grund dafür kann die Betrachtung des Struktur-Modells in PyMol liefern (Abb. 5-5). In diesem Modell liegt das aktive Zentrum nicht frei zugänglich an der Oberfläche, sondern weit im Innern der Protease und ist nur über einen sehr schmalen Zugang erreichbar, was auf eine hohe Substratspezifität hindeutet. Die massenspektrometrischen Analysen des α -Caseinhydrolysats lieferten ebenfalls Indizien dafür, dass YggG spezifisch ist (4.2.3.6). So

ergaben die Analysen, dass YggG bevorzugt zwischen F/F schneidet. Diese Daten wurden bestätigt, indem eine Reihe unterschiedlicher Peptide, basierend auf dem Schnittmuster des α -Caseinhydrolysats (Abb.4.28), mit YggG inkubiert wurde (4.2.3.7). Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass Peptide deren Sequenzen F/F enthielten proteolysiert wurden. Andere Peptide, die kein FF in der Aminosäuresequenzabfolge hatten, wurden nicht durch YggG proteolysiert. Alle anderen im α -Caseinhydrolysat identifizierten Schnittstellen entstehen wahrscheinlich erst als Folgeabbau nachdem der initiiierende Schnitt F/F erfolgt ist, benötigen aber vermutlich zusätzlich die richtige Konformation bzw. Zugänglichkeit der Schnittstelle. So konnte in *in vitro* Versuchen auch in Gegenwart des Peptids EVLNENLLRFFV kein Abbau von anderen Peptiden, ohne FF in der Sequenz, festgestellt werden. Würde der initiiierende Schnitt zwischen EVLNENLLRF / FV ausreichen um die Aktivität von YggG zu steigern, müssten auch diese Peptide proteolysiert werden. So deuten die Daten daraufhin, dass YggG eine Protease ist, die sehr spezifisch schneidet. Die Betrachtung der unterschiedlichen Peptide mit FF in der Sequenzabfolge liefern die ersten Hinweise für die notwendige Aminosäureumgebung um die Schnittstelle FF. Die Länge der Peptide sowie die Eigenschaften ihrer AS (hydrophile in türkis und hydrophobe gelb markiert) scheinen eine Relevanz zu haben, so wird das Peptid ENLLRFFV mit 7,7% wesentlich schlechter proteolysiert, als das Peptid EVLNENLLRFFV mit 20%. Der Grund dafür ist sehr wahrscheinlich zum Einen die unterschiedliche Peptidlänge, insbesondere da beide den gleichen hydrophilen N-Terminus und hydrophoben C-Terminus aufweisen. Zum Anderen könnte aber auch der etwas höhere Anteil an hydrophoben AS mit VL am N-terminalen Bereich wichtig sein. Letztendlich scheint jedoch die Hydrophobizität am N-Terminus von größerer Bedeutung zu sein als die Länge des Peptids. Unterstrichen werden diese Annahmen durch den Abbau von LNENLLRFFV mit 26%, der um 6% höher ist als der Umsatz von EVLNENLLRFFV. So scheint der hydrophobe C-terminale Rest hierbei einen entscheidende Rolle zu spielen. Der wichtigste Hinweis wird aber durch den Umsatz von VLNENLLRFFVAPFP erbracht, der bei 84% liegt. Das Peptid ist sowohl C-terminal länger als auch hydrophober als die anderen Peptide und zeigt so den effektivsten Umsatz. Das Peptid weist N-terminal zwei und C-terminal sieben hydrophobe AS auf, diese sind offensichtlich für die Erkennung durch YggG vorteilhaft. Des Weiteren wurde in den Peptidanalysen die Relevanz der Schnittstelle FF belegt, so zeigte das Peptid EVLNENLLRFYV nur einen Umsatz von 3%. Somit ist die zusätzliche OH-Gruppe des Tyrosins, welche der AS den hydrophilen Charakter gibt, ausschlaggebend für den signifikant schlechteren Abbau. Damit ist nicht die Struktur von Phenylalanin allein, sondern auch dessen Hydrophobizität wichtig.

Die weitere *in vitro* Charakterisierung von YggG, die mittels der Peptide erfolgte, lieferte die ersten Hinweise für die optimalen Pufferbedingungen. So zeigten sich keine signifikanten Unterschiede des Peptidabbaus in Gegenwart unterschiedlicher NaCl- oder NaH₂PO₄-Konzentrationen (4.2.3.11 und 4.2.3.12). Der einzige erwähnenswerte Unterschied ist der Abbau von α -Casein und EVLNENLLRFFV in Wasser. Während α -Casein in Wasser einen Abbau durch YggG aufweist, wird EVLNENLLRFFV kaum proteolysiert. Daraus folgt, dass die Salzkonzentration die Konformation des Substrats mehr beeinflusst als die Struktur von YggG. Interessante Ergebnisse lieferten die pH-Reihe und die ZnCl₂-Reihe (4.2.3.9 und 4.2.2.12). Hierbei zeigt sich die höchste YggG-Aktivität bei pH 6,0 (MES) und einer ZnCl₂-Konzentration von 25 μ M. Die gesteigerte Aktivität bei geringerem pH-Wert lässt sich durch die erhöhte Protonenanzahl im umgebenden Milieu erklären. Dadurch nehmen die Carboxylgruppen der Aminosäuren ein Proton auf, die Protonierung an einer bestimmten Stelle kann dabei durch neu entstehende Wasserstoffbrückenbindungen zu einer Stabilisierung der aktiven Form führen. Eine andere Möglichkeit bestünde darin, dass die Protonierung der Carboxylgruppe zur Auflösung einer Salzbrücke führt und damit der Zugang zum aktiven Zentrum besser ermöglicht wird. Liegt der pH-Wert hingegen höher (pH 10-11) zeigt sich, dass YggG seine Aktivität verliert. Der Grund dafür ist vermutlich, dass die Anzahl der Protonen im umgebenden Milieu sinkt, die Aminogruppen ein Proton abgeben und somit ihre positive Ladung verlieren. In Folge dessen gehen elektrostatische Wechselwirkungen mit benachbarten Aminosäuren verloren und das aktive Zentrum von YggG verändert seine Struktur so, dass es nicht mehr für Substrate zugänglich ist. Die höhere Aktivität durch ZnCl₂ lässt sich dadurch erklären, dass YggG eine Metalloprotease ist. So kann eine geringe Konzentration an ZnCl₂ auf die Protease aktivierend wirken, da durch die Reinigung möglicherweise für einen Teil der aktiven Zentren das notwendige Zink verloren geht. Durch die Erhöhung der Zinkkonzentration in Lösung kann dieser Verlust wieder ausgeglichen werden. Ist die Konzentration der Metallkationen in Lösung jedoch zu hoch kann es auch einen inhibierenden Effekt besitzen. Bei YggG wird das Zinkkation durch drei Aminosäurereste (His, His, Glu) in Position gehalten. Kommt nun ein weiteres Zinkion hinzu, kann es das erste von seiner Position verdrängen, sodass es möglicherweise nur noch durch zwei Aminosäurereste in Position gehalten wird und sich die Konformation des aktiven Zentrums ändert. Dadurch könnte die ursprüngliche Aktivität nicht mehr gegeben sein. Die Kombination der Bedingungen von 25 μ M ZnCl₂ und pH 6,0 (MES) ergab die bisher optimalen Pufferbedingungen für die YggG-Aktivität (4.2.3.13) und zeigte mit einem Abbau des Peptids EVLNENLLRFFV von 97,6% den bisher höchsten Umsatz.

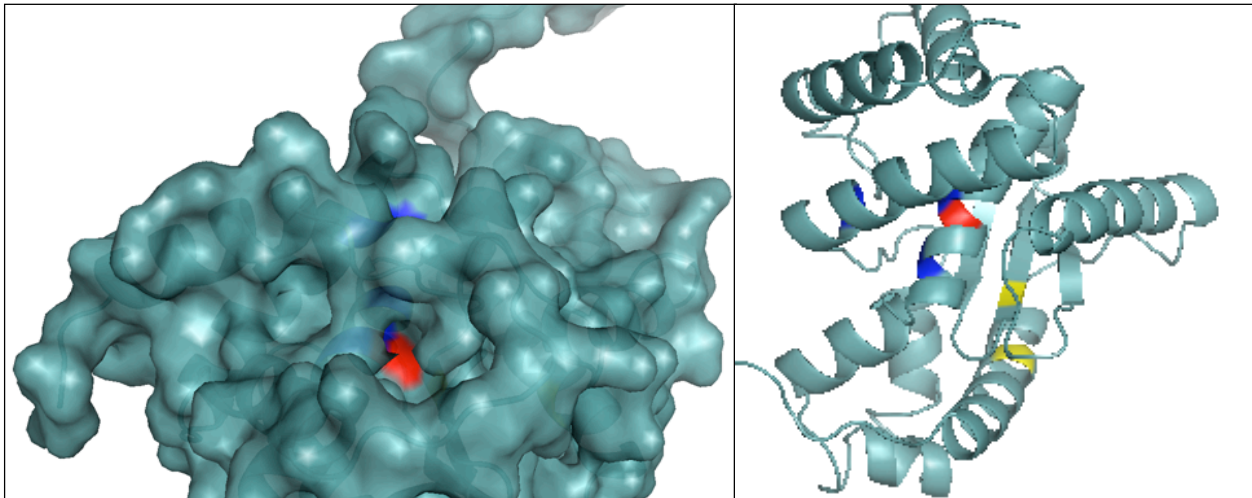


Abb. 5-5: YggG-Modell dargestellt mit PyMol. Das aktive Zentrum ist in Metall-Binde-Reste sind in blau und Cysteine sind in gelb dargestellt.

5.3.2 YggG besitzt eine Disulfidbrücke

YggG besitzt Sequenzvergleichen zur Folge zwei konservierte Cysteine (Abb. 4.44). Dies ist ein Hinweis für eine potentielle Disulfidbrücke. Die nachfolgenden Analysen (4.2.4) ergaben, dass YggG tatsächlich eine Disulfidbrücke besitzt, welche Einfluss auf die Struktur und Aktivität hat. Gebildet wird die Disulfidbrücke auch in einem Deletionsstamm (4.2.4.1), dem die Oxidoreduktase DsbA zur Ausbildung von Disulfidbrücken fehlt. Der Grund dafür ist eine mögliche Luftoxidation der Cysteine. Um die Auswirkung der Disulfidbrücke auf Struktur und Funktionalität zu analysieren, wurden Oligomerisierungs- und Aktivitätsuntersuchungen in Gegenwart von DTT durchgeführt. Diese ergaben, dass reduziertes YggG die gleichen Oligomerisierungszustände besitzt wie oxidiertes YggG (4.2.4.2), wobei ein geringer Anteil als Dimer und der Hauptanteil als Monomer vorliegt (4.2.2.1). Jedoch scheint sich die Struktur in Gegenwart von DTT zu ändern, da die fehlende Disulfidbrücke dazu führt, dass YggG zu einem Substrat von DegP wird, einer Protease, die für den Abbau von denaturierten bzw. entfalteten Proteinen zuständig ist (4.2.4.3). Somit scheint sich die Struktur des reduzierten YggG zu destabilisieren, jedoch nicht komplett, da der Abbau durch DegP langsam und nicht vollständig verläuft. Diese scheinbar leichte Strukturveränderung besitzt einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität von YggG (4.2.4.4). Der α -Caseinabbau mit YggG ist unter reduzierenden Bedingungen stark vermindert. Um auszuschließen, dass das DTT bei α -Casein ebenfalls eine Strukturveränderung hervorruft und deshalb durch YggG vermindert abgebaut wird, wurde auch ein Peptid (EVLNENLLRFFV), ohne Sekundärstruktur, in einem Proteolyseansatz mit reduziertem YggG getestet. Dabei war kein

Umsatz des Peptids zu erkennen. Der zusätzliche Kontrollverdau mit oxidiertem YggG zeigte den üblichen Umsatz von 20%. Somit ist auch der verminderte α -Caseinabbau den reduzierten Cysteinen zuzuschreiben. Für die Aktivität von YggG ist die Disulfidbrücke folglich von großer Bedeutung. Den Grund für den Aktivitätsverlust von YggG, unter reduzierenden Bedingungen, liefert möglicherweise die Betrachtung des Strukturmodells in PyMol (Abb. 5-5, rechts). Das Modell zeigt, dass die zwei Cysteine, in gelb dargestellt, genau gegenüber bzw. hinter dem aktiven Zentrum liegen. Kommt es zu einem Verlust der Disulfidbrücke wäre es möglich, dass sich die Struktur so verändert, dass der Zugang zum aktiven Zentrum nicht mehr möglich ist bzw. die für die Aktivität notwendigen strukturellen Gegebenheiten nicht mehr vorhanden sind.

5.3.3 YggG liegt *in vitro* hauptsächlich als Monomer vor

Wie die Ergebnisse aus der Analyse der Disulfidbrücke bereits zeigten, ändert YggG auch mit reduzierten Cysteinen und daraus resultierender Strukturveränderung und verminderter Aktivität nicht seine oligomeren Zustände, (4.2.2.1 und 4.2.4.2). Diese Daten wurden auch in weiteren Studien des Oligomerisierungszustandes von YggG belegt.

Um eine mögliche Änderung in den Oligomerisierungszuständen von YggG in Gegenwart eines Substrats zu untersuchen, wurde eine Gelfiltration von YggG mit α -Casein durchgeführt. Während einige Proteasen wie z.B. DegP in Gegenwart eines Substrats sehr hohe oligomere Zustände bis zum 24-mer annehmen können (Krojer *et al.*, 2008, Merdanovic *et al.*, 2010), zeigt YggG in Anwesenheit eines Substrats keine Veränderungen des oligomeren Zustands (4.2.3.5). So liegt der Großteil von YggG als Monomer vor. Die stärkste Veränderung seines oligomeren Zustands zeigt hingegen α -Casein, welches in Gegenwart der Protease YggG teilweise bei einem Volumen eluiert, das 525 kDa entspricht. Ein möglicher Grund dafür ist, dass es mit den Abbaufragmenten, welche durch die Proteolyse entstehen, aggregiert und so höhere oligomeren Zustände erreicht. Die Metalloprotease YggG scheint hingegen auch im aktiven Zustand seine oligomeren Zustände beizubehalten.

5.3.4 Eine hohe Expression von aktiven YggG besitzt Einfluss auf die Flagellensynthese

Die Genomearrays zeigten, dass eine erhöhte Expression von YggG dazu führt, dass fast alle Gene, die in die Flagellensynthese involviert sind, bis um den Faktor 10 herunterreguliert sind. Dabei ist die Aktivität des exprimierten YggG von Bedeutung. Die Schwärmassays, die zur Verifizierung der Genomearray-Daten durchgeführt wurden, bestätigen dies. So zeigte die inaktive Mutante YggGE131Q nicht denselben Effekt, wie die aktive Form. Während bei dem aktiven YggG die Zellen nicht mehr in der Lage sind zu schwärmen, können sie sich bei der inaktiven Variante auf dem Schwärmagar fortbewegen. Dies spricht dafür, dass YggGE131Q die Flagellensynthese nicht beeinflusst, wohingegen das YggG mit Proteasefunktion in einem sehr frühen Stadium bzw. vor Beginn der Flagellensynthese einen inhibierenden Effekt ausübt, wie der folgende Abschnitt belegt.

Die Flagellensynthese verläuft in drei Übergangsphasen, die in frühe (Klasse 1), mittlere (Klasse 2) und späte Gene (Klasse 3) unterteilt werden (Abb. 5-6). Die Expression der Gene der späteren Klassen erfolgt erst, wenn alle Gene der vorangegangenen Klasse exprimiert wurden (Komeda, 1986). Zu den frühen Genen gehören *flhC* und *flhD*, deren Expression wird durch verschiedene Umwelteinflüsse wie z.B. Temperatur (Adler *et al.*, 1967), höhere Konzentrationen an anorganischen Salzen und Alkohol (Li *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1993), aber auch durch andere Transkriptionsfaktoren reguliert. Die Proteine FlhC und FlhD bilden einen heteromultimeren Komplex, der als Transkriptionsaktivator fungiert und die Transkription der σ^{70} -abhängigen Promotoren der Klasse 2 Gene stimuliert (Kutsukake *et al.*, 1990; Liu und Matsumura, 1994). Die Klasse 2 Gene kodieren für Proteine, die für die Struktur und den Aufbau des Basal-Körpers der Flagelle HBB (Hook Basal Body) benötigt werden. Zudem gehören zur Klasse 2 die Gene der zwei Regulator-Proteine FlgM und FliA (Gillen und Hughes, 1991; Ohnishi *et al.*, 1990). Das Gen *fliA* kodiert für den alternativen Transkriptionsfaktor σ^{28} , dieser wird speziell für die Transkription der Klasse 3 Promotoren benötigt (Liu und Matsumura, 1995). Das *flgM* Gen kodiert für den Anti- σ^{28} -Faktor, der die σ^{28} -Aktivität solange inhibiert bis alle Genprodukte der Klasse 2 funktionell sind (Kutsukake und Iino, 1994). Erst wenn die HBB-Struktur komplett ist, wird ein Signal an das Typ-III-Sekretionssystem geleitet, welches den Transport der HBB-Untereinheiten stoppt. FlgM löst sich von σ^{28} und wird über die HBB-Struktur freigesetzt (Hughes *et al.*, 1993). σ^{28} ist aktiv und kann die Expression der Klasse 3 Gene einleiten (Ide *et al.*, 1999; Schaubach und Drombroski, 1999). Diese kodieren für Proteine, die in der finalen Ausbildung der Flagelle sowie in die Chemotaxis involviert sind. So polymerisieren beispielsweise FliC und FljB zu einem langen externen Filament, dem Propeller. CheB ist hingegen Teil des Chemotaxis-

Regulator-Systeme während (Hess *et al.*, 1988) MotA zusammen mit MotB an der Rotationsbewegung der Flagelle beteiligt ist (Dean *et al.*, 1984; Terashima *et al.*, 2008).

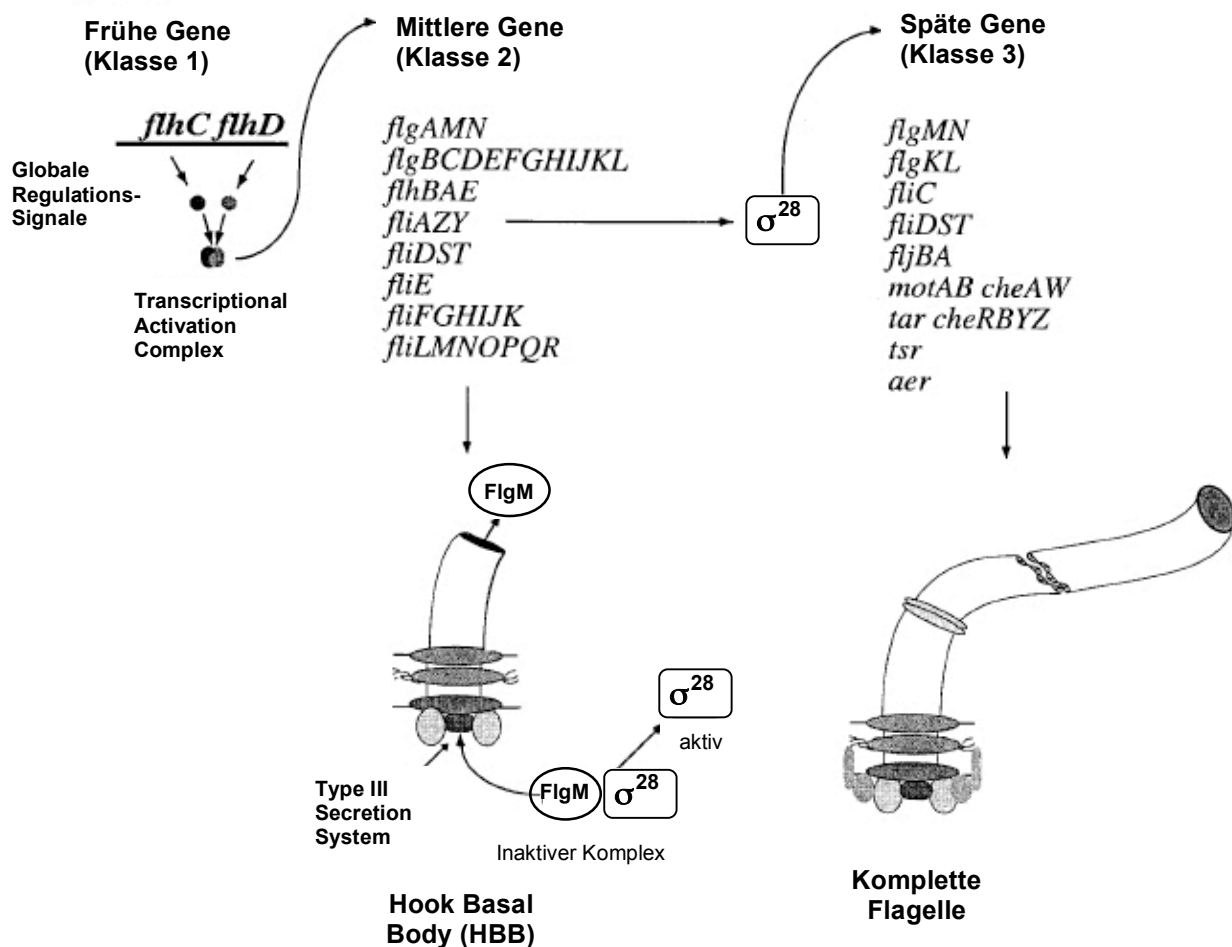


Abb. 5-6: Die Übergangsphasen der Flagellensynthese (Chilcott und Hughes, 2000, modifiziert)

Bei der Betrachtung des Genomearrays (4.3) fällt auf, dass im *yggG* Deletionsstamm + pCL4 zwar alle Gene der Flagellenausbildung herunterreguliert sind, sich aber die stärkste Regulation mit dem Faktor -10 und -9 bei den Genen *flhC* und *flhD* zeigt. Diese sind die Initiatoren der Flagellensynthese und scheinen in diesem Fall der Schlüssel zur Begründung des fehlenden Schwärmverhaltens des *yggG* Deletionsstamms + pCL4 zu sein. Neben den bereits erwähnten allgemeinen Faktoren wie Temperatur und anorganische Salze, ist die Transkription von *flhC* und *flhD* zusätzlich von Transkriptionsfaktoren und Regulationswegen abhängig. Dazu gehören z.B. der Transkriptionsfaktor H-NS (Dorman *et al.*, 1999, Tendeng *et al.*, 2000, Landini und Zehnder, 2002), aber auch der Rcs-Weg (Takeda *et al.*, 2001, Francez-Charlot *et al.*, 2003). Der Rcs-Weg ist ein Zwei-Komponenten-System, dass auf Stress in der Zellhülle, im Besonderen in der Peptidoglykanschicht z.B. hervorgerufen durch Antibiotika, reagiert. Der Rcs-Weg erhöht die Transkriptionsrate von Genen, die in die

Kapselbildung involviert sind (Stout und Gottesman, 1990). Zusätzlich ist RcsB aber auch ein negativer Regulator der Flagellensynthese und inhibiert die Transkription von *flhC* und *flhD* (Wang *et al.*, 2007). Interessant ist der Rcs-Weg in diesem Kontext, da *yggG* ein Bestandteil des Rcs-Regulons ist (Ferrières und Clarke, 2003, Hagiwara *et al.*, 2003). Erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang auch die Ergebnisse der β -Galaktosidaseassays zur Untersuchung der Promotoraktivität, welche zeigten, dass die *yggG*_Promotor-*lacZ*-Fusion in niederosmolarem Medium eine erhöhte β -Galaktosidaseaktivität aufweist (4.2.5.3). Somit ist die Transkription des *yggG*-Promotors hochreguliert, wenn die Zelle sich aufgrund einer geringeren Salzkonzentration ausdehnt. Dies bedeutet einen erhöhten Stress in der Zellhülle und somit in der Peptidoglykanschicht, wodurch wiederum der Rcs-Weg aktiviert wird. Das untermauert die Aussage, dass YggG ein Bestandteil des Rcs-Regulons darstellt.

Zur Untersuchung des Zusammenhangs von YggG und dem Rcs-Weg, im Bezug auf die Flagellensynthese, wurden Schwärmassays vom *rscB* Deletionsstamm mit und ohne pCL4 (*yggG*/pCS19) durchgeführt. Diese zeigten, dass die Bakterien trotz Expression des aktiven YggG, in der Lage sind zu schwärmen und damit Flagellen auszubilden. Somit ist die herunterregulierte Expression von *flhC* und *flhD* tatsächlich auf einen aktivierten Rcs-Weg zurückzuführen. Dies muss jedoch der Proteaseaktivität von YggG zugeschrieben werden, da die erhöhte Expression der inaktiven Mutante im Wildtypstamm keinen Effekt auf die Flagellensynthese besitzt. Damit kann ausgeschlossen werden dass allein die Expression des Proteins den Rcs-Weg aktiviert. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass das aktive YggG im Rahmen der Peptidoglykansynthese degradative oder möglicherweise regulatorische Funktionen übernimmt. Durch eine Überexpression des YggG verläuft diese Degradation aber vermutlich unkontrolliert, wodurch sich der Stress in der Peptidoglykanschicht erhöht und so der Rcs-Weg aktiviert wird. Somit ist YggG nicht nur ein Bestandteil des Rcs-Regulons, sondern stellt bei erhöhten Mengen auch einen Regulator dieses Systems dar. Auch andere überexprimierte Proteine wie DjlA, konnten mit einer Regulation des Rcs-Wegs in Zusammenhang gebracht werden (Clarke *et al.*, 1997 und 2002, Kelley und Georgopoulos, 1997). DjlA ist ein Innenmembranprotein, welches vermutlich über eine direkte Interaktion RcsC aktiviert, dies geschieht unabhängig von RcsF, einer Komponente des Rcs-Weges in der Außenmembran (Abb. 5-7). RcsF überträgt dabei normalerweise, in einem bisher noch unbekannten Mechanismus, ein Signal an RcsC, welches in der Innenmembran lokalisiert ist. Da DjlA die Aktivierung des Rcs-Weges RcsF unabhängig vollziehen kann, existiert die Annahme, dass es zwei Wege zur Signalübertragung an RcsC gibt (Castanié-Cornet *et al.*, 2006). Somit könnte möglicherweise auch YggG als

Außenmembranprotein eine direkte Funktion in der Aktivierung des Rcs-Weges übernehmen (Abb. 5-7), was die Ergebnisse dieser Arbeit ebenfalls erklären könnte. Ob YggG dabei in diesen potentiellen zweiten Weg involviert ist, muss jedoch noch weiter untersucht werden.

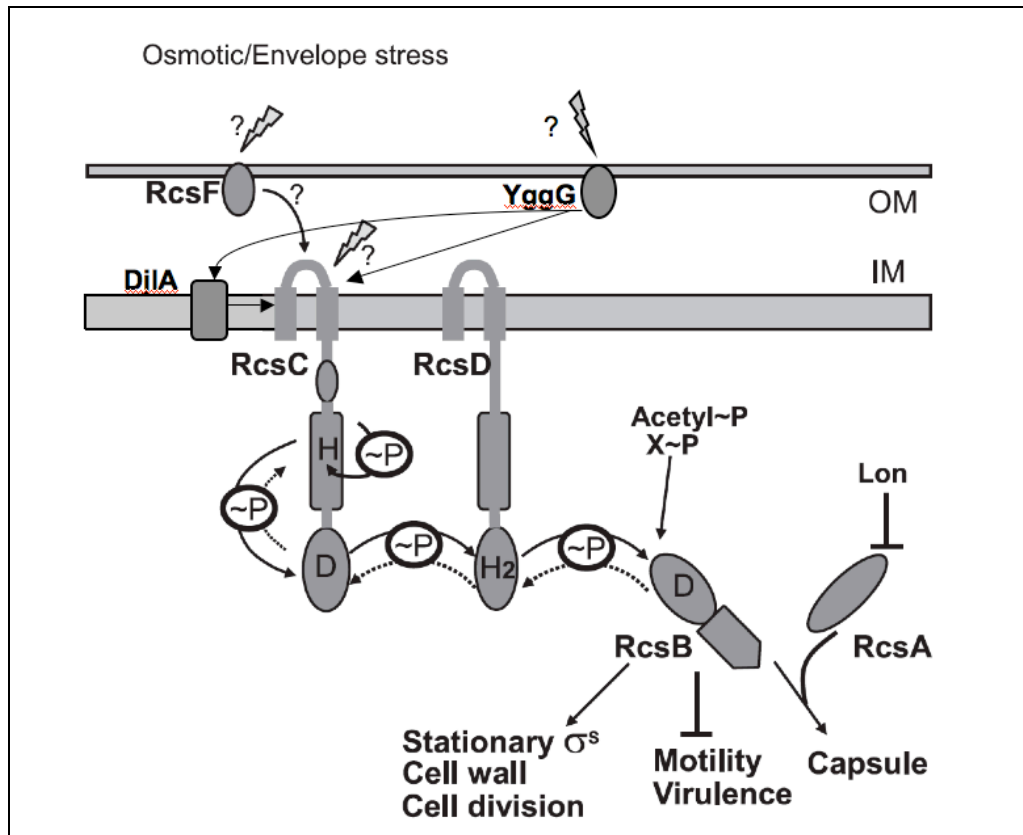


Abb. 5-7: Modell des Rcs-Weges mit potentieller Funktion von YggG (Wang *et al.*, 2007, modifiziert)

5.3.5 Potentielle Interaktionspartner oder Substrate von YggG

Die Ergebnisse aus der Co-Immunpräzipitation ergaben, dass bisher noch uncharakterisierte Proteine wie YgdI und YjE1 zu den potentiellen Interaktionspartnern bzw. Substraten von YggG gehören. Bei YgdI und YjE1 handelt es sich nach der Signalsequenz zu urteilen um Lipoproteine mit Lokalisation in der Außenmembran. Damit sind zwei Theorien möglich, entweder sind sie Substrate von YggG und werden unter bestimmten Umständen vollständig oder regulatorisch proteolysiert oder sie stellen in einem größeren Komplex Interaktionspartner von YggG dar. Dieser könnte z.B. mit dem BAM-Komplex (1.4) vergleichbar sein, der ebenfalls in der Außenmembran lokalisiert ist und Proteine mit β -Fassstruktur in die Membran integriert. Jedoch bedarf es an dieser Stelle noch weiterer Untersuchungen.

5.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern die ersten Hinweise auf die Prozesse, in welche die Metalloproteasen YfgC und YggG involviert sind. Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte besitzt YfgC sehr wahrscheinlich redundante Funktionen zu SurA und ist somit Teil der periplasmatischen Proteinqualitätskontrolle und übernimmt dabei sowohl die Funktion eines Chaperons, als auch einer Protease. Insbesondere in der Biogenese von Lipo- und Außenmembranproteinen. Um diese Hinweise näher zu analysieren, sollten weitere *in vivo* Untersuchungen durchgeführt werden. Zum einen könnten *yfgC-lacZ*-Fusionen in den verschiedenen Deletionsstämmen, wie *surA*- oder *degP* Knockoutstämmen, unter erhöhten Stressbedingungen auf die β -Galaktosidaseaktivität untersucht werden. Zusätzlich könnte auch der m-RNA Gehalt von *yfgC* in den erwähnten Deletionsstämmen und entsprechenden Bedingungen ermittelt werden. Des Weiteren sollten Protein-Protein Interaktionen zwischen YfgC und LptD oder LamB durch andere Methoden verifiziert werden, wie z.B. chemisches 'Crosslinking' gereinigter Proteine oder Protease- bzw. Rückfaltungsassays *in vitro*. Im Zuge dieser Analysen sollte ein besonderes Augenmerk auf die Optimierung der erforderlichen Reaktionsbedingungen gelegt werden.

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Außenmembran deuten daraufhin, dass unter den getesteten Bedingungen Lipoproteine, wie z.B. YggG, potentielle Substrate von YfgC darstellen und YfgC an deren Faltung beteiligt sein könnte. Um diese Daten zu verifizieren sollten weitere *in vivo* Analysen durchgeführt werden, die den Gehalt an akkumulierten Lipoproteinen im Periplasma ermitteln. Der Nachweis könnte dabei mittels Western Blot Analyse von periplasmatischen und Außenmembranextrakten aus Wildtyp-, *yfgC*- und *yfgC degP* Deletionsstämmen erfolgen. Zudem könnten *in vitro* Rückfaltungsassays von denaturiertem YggG in Anwesenheit von YfgC durchgeführt werden. Liefern diese Versuche weitere Hinweise auf eine Chaperonfunktion von YfgC, sollte zusätzlich zu den bisherigen Untersuchungen des Oligomerisierungszustands, dieser auch in Gegenwart eines Substrats mittels Gelfiltration und chemischem 'Crosslinking' charakterisiert werden. Außerdem wäre auch die Analyse der vier TPR-Domänen in diesem Prozess relevant, z.B. durch die Einführung von Punktmutationen oder Deletionen in diesen Domänen. Zudem wäre aufgrund der vorhandenen TPR-Domänen eine Kristallisation von YfgC sinnvoll, um die Anordnung dieser Domänen näher zu analysieren.

Die Daten die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen für die Metalloprotease YggG, wurden, ergaben, dass es ein Lipoprotein mit Lokalisation in der Außenmembran ist. Die Ergebnisse aus massenspektrometrischen Analysen deuten daraufhin, dass YggG weitere nicht charakterisierte Lipoproteine als potentielle Substrate oder Interaktionspartner besitzt. Diese

Hinweise sollten durch weitere Untersuchungen, wie für YfgC z.B. durch Außenmembranpräparationen des *yggG* Deletionsstamms mit und ohne pCL4 (*yggG*/pCS19) und deren massenspektrometrische Analysen und Co-IP bestätigt werden. Sinnvoll wäre eines dieser Substrate bzw. Interaktionspartner zu klonieren und zu reinigen, um damit *in vitro* Versuche durchzuführen, wie Degradationsreaktionen oder Gelfiltrationen und chemisches 'Crosslinking' sowie die ITC (Isothermale Titrations Calorimetrie). Weitere Ergebnisse zu YggG lieferten die Proteolysereaktionen mit dem Peptid, das nach dem Schnittmuster des α -Caseinabbaus synthetisiert wurde. In einer Kooperation mit der AG Kaiser, CGC Dortmund soll anhand dieser Daten ein Substrat hergestellt werden, das sich für kolorimetrische Messungen eignet. Damit kann eine Vielzahl von Bedingungen in *in vitro* Reaktionen getestet werden, um so die Bedingungen für diese Protease weiter zu optimieren.

Die Daten der Genomearrays und die darauf basierenden Schwärmassays lieferten die ersten Hinweise für die physiologische Rolle von YggG. Sie zeigten, dass YggG ein Regulator der Flagellensynthese ist, indem es den Rcs-Weg direkt oder indirekt reguliert. Um die Hinweise näher zu untersuchen, muss eine massenspektrometrische Analyse der Außenmembranzusammensetzung, sowie der Zusammensetzung des periplasmatischen Extrakts eines YggG überexprimierenden Stamms im Vergleich zum Wildtyp erfolgen. So können Proteine, die im Expressionsstamm geringer sind oder fehlen, ein Hinweis auf das Substrat sein, welches YggG proteolysiert und dadurch indirekt den Rcs-Weg reguliert. Dadurch könnten die Mechanismen, in denen YggG relevant ist, weiter aufgeklärt werden. Die weiteren Charakterisierungen können letztendlich helfen, die Funktionen der Proteine und deren physiologische Bedeutung in *E. coli* noch genauer aufzuklären.

6. Zusammenfassung

Die Zellhülle von *E. coli* besitzt ein System zur Proteinqualitätskontrolle, welche sowohl die richtige Faltung von Proteinen als auch den Abbau von fehlgefalteten, akkumulierten Proteinen gewährleistet. Dabei sind verschiedene Chaperone und Proteasen am Prozess der Proteinqualitätskontrolle beteiligt, wie z.B. das Hitzeschockprotein DegP (Spiess *et al.*, 1999), die Prolinisomerase SurA und das Chaperon Skp (Vertommen *et al.*, 2009). Die erwähnten Proteine machen jedoch nur einen kleinen Teil der periplasmatischen Proteinqualitätskontrolle aus. Viele Proteine, die in der Zellhülle agieren, sind bisher noch uncharakterisiert. Dabei beruhen deren Lokalisation und Funktion nur auf Annahmen aus Sequenzvergleichen und bioinformatischen Vorhersagen. Dazu gehören auch die uncharakterisierten Proteine YfgC und YggG, die anhand der Aminosäuresequenzen den Metalloproteasen zugeordnet werden. Sie besitzen das HEXXH-Motiv, welches in den Metalloproteasen der Familie M48 vorkommt. Die Proteasen dieser Familie wie z.B. HtpX und Oma1 sind oft in die Proteinqualitätskontrolle involviert. So ließ das Vorhandensein des HEXXH Motiv vermuten, dass auch YfgC und YggG an der Proteinqualitätskontrolle in *E. coli* beteiligt sind. Um diesem Hinweis nachzugehen, war das Ziel dieser Arbeit die *in vivo* und *in vitro* Charakterisierung dieser Proteine.

Die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden, lieferten zahlreiche interessante Erkenntnisse für die Metalloproteasen YfgC und YggG. So zeigte die Analyse unterschiedlicher Membranfraktionen, dass YfgC ein lösliches periplasmatisches Protein ist, obwohl es nach den `Transmembran Prediction Servern` DAS (URL: <http://www.sbc.su.se>) und TMPred (URL: <http://www.ch.embnet.org>) drei Transmembrandomänen besitzen soll. Zudem liegt es nach den Ergebnissen der Gelfiltration *in vitro* als Monomer vor. Um die physiologische Rolle zu untersuchen wurden transkriptionelle Promotor-*lacZ*-Fusionen hergestellt, die im Vergleich zu anderen Promotoren und unter verschiedenen Wachstumsbedingungen analysiert wurden. Für *yfgC* ergaben die Untersuchungen dieser Fusionen, dass es einen starken Promotor besitzt, vergleichbar mit dem von *malK* (Kühnau *et al.*, 1991). Die weitere Charakterisierung der physiologischen Eigenschaften erfolgte durch die Untersuchung von Deletionsstämmen. Hierbei war vor allem der *surA yfgC* Deletionsstamm auffällig, der bei 42°C ein sehr schwaches Wachstum aufwies und dessen Bakterienzellen in den mikroskopischen Aufnahmen kleiner als die der Einzeldelentionsstämmen waren. Zusätzlich zeigten Komplementationsassays, dass YfgC sowohl in aktiver als auch in inaktiver Form den *surA yfgC* Deletionsstamm komplementieren kann. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass SurA und YfgC redundante Funktionen und gleiche Substrate besitzen. Substrate von SurA sind z.B. Außenmembranproteine wie Lamb

und LptD (Ureta *et al.*, 2007; Vertommen *et al.*, 2009). Untersuchungen von Doppeldeletionsstämmen (Dissertation, J. Weski) lieferten erste Hinweise, dass LamB tatsächlich ein Substrat von YfgC darstellen könnte. Im Rahmen dieser Arbeit ließ sich die Interaktion von YfgC und LamB mittels Co-Immunpräzipitation bestätigen. Das Außenmembranprotein LptD erwies sich ebenfalls als ein potentielles Substrat von YfgC. Sowohl im Ganzzellextrakt als auch in der Außenmembranfraktion zeigte sich, dass LptD in den Proben, in denen das aktive YfgC überexprimiert wurde, in geringeren Mengen vorhanden ist. Um weitere native Substrate von YfgC zu identifizieren, wurden Außenmembrananalysen unter erhöhten Stressbedingungen (42°C und hoher Osmolarität) mittels Massenspektrometrie durchgeführt. Dabei erwiesen sich Lipoproteine als potentielle Substrate, unter anderem auch YggG. Zusammenfassend betrachtet führen die Ergebnisse dieser Arbeit zu der Annahme, dass YfgC in der Assemblierung von Außenmembranproteinen und der Proteinqualitätskontrolle, unter Stressbedingungen, involviert ist.

YggG zeigte in der Co-Immunpräzipitation und in chemischen 'Crosslinkreaktionen' eine Interaktion mit YfgC. Die Vermutung, dass YggG ein potentielles Substrat von YfgC ist, wurde dadurch belegt. Wie sich im Rahmen dieser Arbeit durch die Analyse von Zellfraktionen zeigte, ist YggG ein Lipoprotein mit Lokalisation in der Außenmembran. YggG besitzt eine hohe Substratspezifität. Die massenspektrometrischen Analysen des α -Caseinhydrolysats und die Untersuchung der daraus synthetisierten Peptide (P. Hauske AG Kaiser, CGC Dortmund) ergaben, dass YggG nur zwischen den Aminosäuren F/F schneidet. Mit Hilfe der Peptide wurde die Proteolyseaktivität von YggG in Abhängigkeit verschiedener Pufferbedingungen untersucht. Dabei wies YggG eine deutliche Aktivitätszunahme um 76%, bei einem pH-Wert von 6,0 in MES-Puffer mit einem Zusatz von 25 μ M ZnCl₂ auf.

Wie im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurde, besitzt YggG eine Disulfidbrücke, die für die proteolytische Aktivität von Bedeutung ist. Die Disulfidbrücke hat einen Einfluss auf die Struktur von YggG, so wird reduziertes YggG zu einem Substrat der 'Housecleaning'-Protease DegP. Der oligomere Zustand von YggG ist hingegen unabhängig von der Disulfidbrücke. Die Ergebnisse der Gelfiltration und chemischer 'Crosslinks' zeigten, dass YggG *in vitro* sowohl in oxidiert als auch in reduzierter Form überwiegend als Monomer vorliegt. Zu Charakterisierung der physiologischen Bedeutung, wurden Genomearrays von *yfgC* und *yggG* Deletionsstämmen, den entsprechend komplementierten Stämmen und dem Wildtyp BW30270 durchgeführt. Die Ergebnisse wurden zusätzlich mittels qRT-PCR verifiziert. Die auffälligsten Daten lieferten hierbei vor allem der komplementierte *yggG* Deletionsstamm, in dem alle Gene der Flagellensynthese stark herunterreguliert waren. Auch die funktionelle Analyse durch Schwärmassays zeigte, dass die Bakterien des komplementierten *yggG*

Deletionsstamms nicht in der Lage sind zu schwärmen, was auf die fehlenden Flagellen zurückzuführen ist. Laut Ferrières und Clarke (2003) sowie Hagiwara *et al.* (2003) ist YggG Teil des Rcs-Regulons. Dies ist interessant, da über den Rcs-Weg, speziell über den Regulator RcsB, die Flagellensynthese negativ reguliert wird. Das liefert einen potentiellen Zusammenhang zwischen YggG dem Rcs-Weg und der Flagellensynthese. Aufgrund dieser Hinweise wurde YggG in einem *rscB* Deletionsstamm überexprimiert und mit den Bakterien Schwärmassays durchgeführt. Die Bakterien waren wieder in der Lage zu schwärmen. Somit ist YggG indirekt an der Regulation der Flagellensynthese beteiligt.

Die Charakterisierung der Metalloproteasen YfgC und YggG lieferten die ersten Hinweise bzgl. Ihrer Substratspezifität, des oligomeren Zustände sowie ihrer physiologischen Bedeutung in *E. coli* und bilden eine gute Basis zur weiteren Charakterisierung.

7. Literatur

- Adler J, Templeton B. (1967)** The effect of environmental conditions on the motility of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol.* 46(2):175-84.
- Akiyama Y., Kamitani S., Kusukawa N., Ito K. (1992)** In vitro catalysis of oxidative folding of disulfide-bonded proteins by the *Escherichia coli* dsbA (ppfA) gene product. *J. Biol. Chem.* 267:22440-22445
- Andersen C, Hughes C, Koronakis V. (2001)** Protein export and drug efflux through bacterial channel-tunnels. *Curr Opin Cell Biol.* 3(4):412-6.
- Arie, J.P., Sassoon, N. und Betton, J.M. (2001)** Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 39: 199-210.
- Arsène F, Tomoyasu T, Bukau B. (2000)** The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol.* 55(1-3):3-9.
- Baars L, Ytterberg AJ, Drew D, Wagner S, Thilo C, van Wijk KJ, de Gier JW. (2006)** Defining the role of the *Escherichia coli* chaperone SecB using comparative proteomics. *J Biol Chem.* 14;281(15):10024-34.
- Baldi, A., De Luca, A., Morini, M., Battista, T., Felsani, A., Baldi, F. et al. (2002)** The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells. *Oncogene.* 21: 6684-6688.
- Baldi, A., Mottolese, M., Vincenzi, B., Campioni, M., Mellone, P., Di Marino, M. et al. (2008)** The serine protease HtrA1 is a novel prognostic factor for human mesothelioma. *Pharmacogenomics.* 9: 1069-1077.
- Bao YC, Tsuruga H, Hirai M, Yasuda K, Yokoi N, Kitamura T, Kumagai H. (2003)** Identification of a human cDNA sequence which encodes a novel membrane-associated protein containing a zinc metalloprotease motif. *DNA Res.* 10(3):123-8.
- Becker AB, Roth RA. (1993)** Identification of glutamate-169 as the third zinc-binding residue in proteinase III, a member of the family of insulin-degrading enzymes. *Biochem J.* 292 (Pt 1):137-42.
- Behrens S., Maier R., de Cock H., Schmid F.X., Gross C.A. (2001)** The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity. *EMBO J.* 20:285-294
- Beloin C, Michaelis K, Lindner K, Landini P, Hacker J, Ghigo JM, Dobrindt U. (2006)** The transcriptional antiterminator RfaH represses biofilm formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 188(4):1316-31.
- Betton JM, Sassoon N, Hofnung M, Laurent M. (1998)** Degradation versus aggregation of misfolded maltose-binding protein in the periplasm of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 273(15):8897-902.

Bitto E., McKay D.B. (2003) The periplasmic molecular chaperone protein SurA binds a peptide motif that is characteristic of integral outer membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 278:49316-49322

Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* 277(5331):1453-62.

Bode W, Gomis-Rüth FX, Huber R, Zwilling R, Stöcker W. (1992) Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases. *Nature.* 358(6382):164-7.

Bonnefoy N, Kermorgant M, Groudinsky O, Minet M, Slonimski PP, Dujardin G. (1994) Cloning of a human gene involved in cytochrome oxidase assembly by functional complementation of an *oxa1*- mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(25):11978-82.

Bos MP, Robert V, Tommassen J. (2007a) Functioning of outer membrane protein assembly factor Omp85 requires a single POTRA domain. *EMBO Rep.* (12):1149-54.

Bos MP, Robert V, Tommassen J. (2007b) Biogenesis of the Gram-Negative Bacterial Outer Membrane *Annu. Rev. Microbiol.* 61:191–214

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.

Bukau B, Ehrmann M, Boos W. (1986) Osmoregulation of the maltose regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 166(3):884-91.

Castanié-Cornet MP, Cam K, Jacq A. (2006) F is an outer membrane lipoprotein involved in the RcsCDB phosphorelay signaling pathway in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 188(12):4264-70.

Chiba S, Akiyama Y, Mori H, Matsuo E, Ito K. (2000) Length recognition at the N-terminal tail for the initiation of FtsH-mediated proteolysis. *EMBO Rep.* 1(1):47-52.

Chien, J., Campioni, M., Shridhar, V. und Baldi, A. (2009) HtrA serine proteases as potential therapeutic targets in cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 9: 451-468.

Chilcott GS, Hughes KT. (2000) Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64(4):694-708.

Clarke DJ, Holland IB, Jacq A. (1997) Point mutations in the transmembrane domain of DjlA, a membrane-linked DnaJ-like protein, abolish its function in promoting colanic acid production via the Rcs signal transduction pathway. *Mol Microbiol.* (5):933-44.

Clarke DJ, Joyce SA, Toutain CM, Jacq A, Holland IB. (2002) Genetic analysis of the RcsC sensor kinase from *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 184(4):1204-8.

Clausen T, Southan C und Ehrmann M (2002) The HtrA Family of Proteases: Implication for Protein Composition and Cell Fate. *Molecular Cell* 10: 443-455

- Cortajarena AL, Regan L. (2006)** Ligand binding by TPR domains. *Protein Sci.* 15(5):1193-8.
- Dallas-Yang Q, Jiang G, Sladek FM. (1998)** Avoiding false positives in colony PCR. *Biotechniques.* 24(4):580-2.
- Danese PN, Silhavy TJ (1997)** The sigma(E) and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 11(9):1183-93.
- Dean G.E., Macnab R.M., Stader J., Matsumura P., Burks C. (1984)** Gene sequence and predicted amino acid sequence of the motA protein, a membrane-associated protein required for flagellar rotation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 159:991-999
- Dorman CJ, Hinton JC, Free A. (1999)** Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid-associated proteins in bacteria. *Trends Microbiol.* 124-8.
- Driessen AJ, Nouwen N., (2008)** Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem.* 77:643-67.
- Duong F, Wickner W. (1997)** Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. *EMBO J.* 16(10):2756-68.
- Fairbanks, G., Steck, T.L. und Wallach, D.F. (1971)** Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry.* 10: 2606-2617.
- Ferrières L, Clarke DJ. (2003)** The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface. *Mol Microbiol.* 50(5):1665-82.
- Foster PL. (2007)** Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 42(5):373-97.
- Francez-Charlot A, Laugel B, Van Gemert A, Dubarry N, Wiorowski F, Castanié-Cornet MP, Gutierrez C, Cam K. (2003)** RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the flhDC operon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 49(3):823-32.
- Fujimura-Kamada K, Nouvet FJ, Michaelis S. (1997)** A novel membrane-associated metalloprotease, Ste24p, is required for the first step of NH₂-terminal processing of the yeast a-factor precursor. *J Cell Biol.* 136(2): 271-85.
- Georgopoulos, C. (2006)** Toothpicks, serendipity and the emergence of the *Escherichia coli* DnaK(Hsp70) and GroEL (Hsp60) chaperone machines. *Genetics.* 174: 1699-1707.
- Gillen KL, Hughes KT. (1991)** Molecular characterization of flgM, a gene encoding a negative regulator of flagellin synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 173(20): 6453-9.
- Grau, S., Baldi, A., Bussani, R., Tian, X., Stefanescu, R., Przybylski, M. et al. (2005)** Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 6021-6026.
- Haldimann A, Wanner BL. (2001)** Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. *J. Bacteriol.* 2001 Nov; 183(21): 6384-93.

- Hess J.F., Oosawa K., Kaplan N., Simon M.I. (1988)** Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis. *Cell* 53: 79-87
- Hooper NM. (1994)** Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* 354(1): 1-6.
- Hu, S.I., Carozza, M., Klein, M., Nantermet, P., Luk, D. und Crowl, R.M. (1998)** Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem.* 273:34406-34412.
- Hughes KT, Gillen KL, Semon MJ, Karlinsey JE. (1993)** Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science.* 262(5137): 1277-80.
- Ide N, Ikebe T, Kutsukake K. (1999)** Reevaluation of the promoter structure of the class 3 flagellar operons of *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Genes Genet Syst.* 74(3): 113-6.
- Inouye K, Kuzuya K, Tonomura B. (1998)** Effect of salts on the solubility of thermolysin: a remarkable increase in the solubility as well as the activity by the addition of salts without aggregation or dispersion of thermolysin. *J Biochem.* 123(5):847-52.
- Ito Y, Kanamaru K, Taniguchi N, Miyamoto S, Tokuda H. (2006)** A novel ligand bound ABC transporter, LolCDE, provides insights into the molecular mechanisms underlying membrane detachment of bacterial lipoproteins. *Mol Microbiol.* 62(4):1064-75.
- Jongeneel CV, Bouvier J, Bairoch A. (1989)** A unique signature identifies a family of zinc-dependent metalloproteases. *FEBS Lett.* 242(2):211-4.
- Käser M, Kambacheld M, Kisters-Woike B., Langer T. (2003)** Oma1, a novel membrane-bound metalloprotease in mitochondria with activities overlapping with the m-AAA protease. *J Biol Chem.* 278(47):46414-23.
- Kelley WL, Georgopoulos C. (1997)** Positive control of the two-component RcsC/B signal transduction network by DjlA: a member of the DnaJ family of molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 25(5):913-31.
- Klebba PE, Hofnung M, Charbit A. (1994)** A model of maltodextrin transport through the sugar-specific porin, LamB, based on deletion analysis. *EMBO J.* 13(19):4670-5.
- Komeda Y. (1986)** Transcriptional control of flagellar genes in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 168(3):1315-8.
- Kornitzer D, Teff D, Altuvia S, Oppenheim AB. (1991)** Isolation, characterization, and sequence of an *Escherichia coli* heat shock gene, htpX. *J Bacteriol.* 173(9):2944-53.
- Koronakis V, Andersen C, Hughes C. (2001)** Channel-tunnels. *Curr Opin Struct Biol.* 11(4):403-7.
- Krojer T, Garrido-Franco M, Huber R, Ehrmann M und Clausen T (2002)** Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a protease-chaperone machine. *Nature* 416: 455-459.
- Krojer T, Pangerl K, Kurt J, Sawa J, Stingl C, Mechtler K, Huber R, Ehrmann M, Clausen T. (2008)** Interplay of PDZ and protease domain of DegP ensures efficient elimination of misfolded proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(22):7702-7.

-
- Krojer T, Sawa J, Schäfer E, Saibil HR, Ehrmann M, Clausen T. (2008)** Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature*. 453(7197):885-90.
- Kühnau S, Reyes M, Sievertsen A, Shuman HA, Boos W. (1991)** The activities of the *Escherichia coli* MalK protein in maltose transport, regulation, and inducer exclusion can be separated by mutations. *J Bacteriol*. 173(7):2180-6.
- Kutsukake K, Iino T. (1994)** Role of the FliA-FlgM regulatory system on the transcriptional control of the flagellar regulon and flagellar formation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*. 176(12):3598-605.
- Kutsukake K, Ohya Y, Iino T. (1990)** Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *Bacteriol*. 172(2):741-7.
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Landini P, Zehnder AJ. (2002)** The global regulatory hns gene negatively affects adhesion to solid surfaces by anaerobically grown *Escherichia coli* by modulating expression of flagellar genes and lipopolysaccharide production. *J Bacteriol*. 184(6):1522-9.
- Langer T, Käser M, Klanner C, Leonhard K. (2001)** AAA proteases of mitochondria: quality control of membrane proteins and regulatory functions during mitochondrial biogenesis. *Biochem Soc Trans*. 29(Pt 4):431-6.
- Laubacher ME, Ades SE. (2008)** The Rcs phosphorelay is a cell envelope stress response activated by peptidoglycan stress and contributes to intrinsic antibiotic resistance. *J Bacteriol*. 190(6):2065-74.
- Lazar S.W., Kolter R. (1996)** SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins. *J. Bacteriol*. 178:1770-1773.
- Li C, Louise CJ, Shi W, Adler J. (1993)** Adverse conditions which cause lack of flagella in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175(8):2229-35.
- Li, Y., Gao, X. und Chen, L. (2009)** GroEL Recognizes an Amphipathic Helix and Binds to the Hydrophobic Side. *J Biol Chem*. 284: 4324-4331.
- Liu X, Matsumura P. (1994)** The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J Bacteriol*. 176(23):7345-51.
- Liu X, Matsumura P. (1995)** An alternative sigma factor controls transcription of flagellar class-III operons in *Escherichia coli*: gene sequence, overproduction, purification and characterization. *Gene*. 164(1):81-4.
- Luirink J, von Heijne G, Houben E, de Gier JW.(2005)** Biogenesis of Inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* 59:329–355.
- Malinverni JC, Werner J, Kim S, Sklar JG, Kahne D, Misra R, Silhavy TJ.(2006)** YfiO stabilizes the YaeT complex and is essential for outer membrane protein assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 61(1):151-64.
-

-
- Maniatis, T., Frisch, E.F. und Sambrook, J. (1982)** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Matsuyama S, Yokota N, Tokuda H. (1997)** A novel outer membrane lipoprotein, LolB (HemM), involved in the LolA (p20)-dependent localization of lipoproteins to the outer membrane of *Escherichia coli*. EMBO J. 16(23):6947-55.
- Merdanovic M, Mamant N, Meltzer M, Poepsel S, Auckenthaler A, Melgaard R, Hauske P, Nagel-Steger L, Clarke AR, Kaiser M, Huber R, Ehrmann M. (2010)** Determinants of structural and functional plasticity of a widely conserved protease chaperone complex. Nat Struct Mol Biol. [Epub ahead of print]
- Miller, J. (1972)** Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Misra R, Peterson A, Ferenci T, Silhavy TJ. (1991)** A genetic approach for analyzing the pathway of LamB assembly into the outer membrane of *Escherichia coli*. J Biol Chem. 266(21):13592-7.
- Missiakas D, Betton JM, Raina S. (1996)** New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH. Mol Microbiol. 21(4):871-84.
- Mock WL, Stanford DJ. (1996)** Arazoformyl dipeptide substrates for thermolysin. Confirmation of a reverse protonation catalytic mechanism. Biochemistry. 35(23):7369-77.
- Mühlradt PF, Golecki JR. (1975)** Asymmetrical distribution and artifactual reorientation of lipopolysaccharide in the outer membrane bilayer of *Salmonella typhimurium*. Eur J Biochem. 51(2):343-52.
- Nikaido H. et al. (2003)** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol Mol Biol Rev. 67(4):593-656.
- Nikaido H, Vaara M. (1985)** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol Rev. 49(1):1-32.
- Oberbauer, B. (1992)** Theodor Escherich-Leben und Werk. Futuamed-Verlag.
- Ojima Y, Komaki M, Nishioka M, Iwatani S, Tsujimoto N, Taya M. (2009)** Introduction of a stress-responsive gene, *yggG*, enhances the yield of L-phenylalanine with decreased acetic acid production in a recombinant *Escherichia coli*. Biotechnol Lett. 31(4):525-30.
- Ohnishi K, Kutsukake K, Suzuki H, Iino T. (1990)** Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. Mol Gen Genet. 221(2):139-47.
- Pfaffl MW. (2001)** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 29(9):e45.
- Qu J, Mayer C, Behrens S, Holst O, Kleinschmidt JH. (2007)** The trimeric periplasmic chaperone Skp of *Escherichia coli* forms 1:1 complexes with outer membrane proteins via hydrophobic and electrostatic interactions. J Mol Biol. 374(1):91-105
-

- Richer E., Raibaud O. (1989)** MalT, the regulatory protein of the *Escherichia coli* maltose system, is an ATP-dependent transcriptional activator. EMBO J. 8:981-987
- Rizzitello, A.E., Harper, J.R. und Silhavy, T.J. (2001)** Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*. J Bacteriol. 183: 6794-6800.
- Robert V, Volokhina EB, Senf F, Bos MP, Van Gelder P, Tommassen J.(2006)** Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif. PLoS Biol. (11):e377.
- Rouviere P.E., Gross C.A. (1996)** SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. Genes Dev. 10:3170-3182
- Ruiz N, Falcone B, Kahne D, Silhavy TJ.(2005)** Chemical conditionality: a genetic strategy to probe organelle assembly. Cell. 121(2):307-17.
- Ruiz N, Silhavy TJ. (2005)** Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope. Curr Opin Microbiol. 8(2):122-6.
- Sakoh M, Ito K, Akiyama Y. (2005)** Proteolytic activity of HtpX, a membrane-bound and stress-controlled protease from *Escherichia coli*. J Biol Chem. 280(39):33305-10.
- Schaubach OL, Dombroski AJ. (1999)** Transcription initiation at the flagellin promoter by RNA polymerase carrying sigma28 from *Salmonella typhimurium*. J Biol Chem. 274(13):8757-63.
- Schulz GE., Ringler P (2002)** OmpA membrane domain as a tight-binding anchor for lipid bilayers. Chembiochem. 3(5):463-6.
- Sharyn L. Rusch and Debra A. Kendall (2007)** Oligomeric states of the SecA and SecYEG core components of the bacterial Sec translocon. Biochim Biophys Acta. 1768(1): 5–12.
- Shimohata N, Chiba S, Saikawa N, Ito K, Akiyama Y. (2002)** The Cpx stress response system of *Escherichia coli* senses plasma membrane proteins and controls HtpX, a membrane protease with a cytosolic active site. Genes Cells. 7(7):653-62.
- Shi W, Li C, Louise CJ, Adler J. (1993)** Mechanism of adverse conditions causing lack of flagella in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 175(8):2236-40.
- Sklar JG, Wu T, Gronenberg LS, Malinverni JC, Kahne D, Silhavy TJ.(2007)** Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A. 104(15):6400-5.
- Sklar JG, Wu T, Kahne D, Silhavy TJ.(2007)** Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. Genes Dev. 21(19):2473-84.
- Spiess C, Beil A, Ehrmann M. (1999)** A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. Cell. 97(3):339-47.
- Stöcker W, Grams F, Baumann U, Reinemer P, Gomis-Rüth FX, McKay DB, Bode W. (1995)** The metzincins--topological and sequential relations between the astacins,

adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* 4(5):823-40.

Stout V., Gottesman S. (1990) RcsB and RcsC: a two-component regulator of capsule synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172:659-669

Tajima T, Yokota N, Matsuyama S, Tokuda H. (1998) Genetic analyses of the in vivo function of LolA, a periplasmic chaperone involved in the outer membrane localization of *Escherichia coli* lipoproteins. *FEBS Lett.* 439(1-2):51-4.

Takeda K, Miyatake H, Yokota N, Matsuyama S, Tokuda H, Miki K. (2003) Crystal structures of bacterial lipoprotein localization factors, LolA and LolB. *EMBO J.* 22(13):3199-209.

Takeda S, Fujisawa Y, Matsubara M, Aiba H, Mizuno T. (2001) A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC --> YojN --> RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour. *Mol Microbiol.* 40(2):440-50.

Tanaka K, Matsuyama SI, Tokuda H. (2001) Deletion of lolB, encoding an outer membrane lipoprotein, is lethal for *Escherichia coli* and causes accumulation of lipoprotein localization intermediates in the periplasm. *J Bacteriol.* 183(22):6538-42.

Tendeng C, Badaut C, Krin E, Gounon P, Ngo S, Danchin A, Rimsky S, Bertin P. (2000) Isolation and characterization of vicH, encoding a new pleiotropic regulator in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol.* 182(7):2026-32.

Terashima H., Kojima S., Homma M. (2008) Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. *Int. Rev. Cytol.* 270:39-85

Tokuda H., Narita S, Matsuyama S, (2004) Lipoprotein trafficking in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol.* 82(1):1-6.

Tsuchiya, A., Yano, M., Tocharus, J., Kojima, H., Fukumoto, M., Kawaichi, M. et al. (2005) Expression of mouse HtrA1 serine protease in normal bone and cartilage and its upregulation in joint cartilage damaged by experimental arthritis. *Bone.* 37: 323-336.

Ureta AR, Endres RG, Wingreen NS, Silhavy TJ. (2007) Kinetic analysis of the assembly of the outer membrane protein LamB in *Escherichia coli* mutants each lacking a secretion or targeting factor in a different cellular compartment. *J Bacteriol.* 189(2):446-54.

Vallee BL, Auld DS. (1990) Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry.* 29(24):5647-59.

van der Laan M, Nouwen NP, Driessen AJM. (2005). *Curr. Opin. Microbiol.* 8:182–87

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3(7): RESEARCH0034

Vertommen D, Ruiz N, Leverrier P, Silhavy TJ, Collet JF.(2009) Characterization of the role of the *Escherichia coli* periplasmic chaperone SurA using differential proteomics. *Proteomics* (9):2432-43.

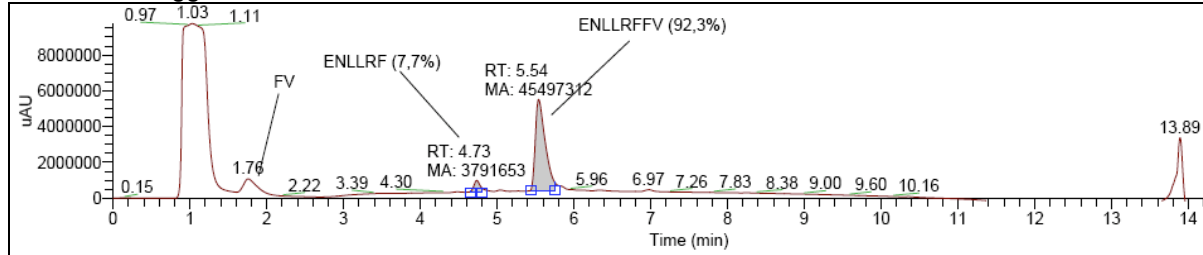
-
- Wang Q, Zhao Y, McClelland M, Harshey RM. (2007)** The RcsCDB signaling system and swarming motility in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*: dual regulation of flagellar and SPI-2 virulence genes. *J Bacteriol.* 189(23):8447-57.
- Wang YF, Dutzler R, Rizkallah PJ, Rosenbusch JP, Schirmer T. (1997)** Channel specificity: structural basis for sugar discrimination and differential flux rates in maltoporin. *J Mol Biol.* 272(1):56-63.
- Werner J, Augustus AM, Misra R. (2003)** Assembly of TolC, a structurally unique and multifunctional outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 185(22):6540-7.
- Wilson CG, Kajander T, Regan L. (2005)** The crystal structure of Nlpl. A prokaryotic tetratricopeptide repeat protein with a globular fold. *FEBS J.* 272(1):166-79.
- Wu, J., Liu, W., Bemis, A., Wang, E., Qiu, Y., Morris, E.A. et al. (2007)** Comparative proteomic characterization of articular cartilage tissue from normal donors and patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 56: 3675-3684.
- Wu T, Malinverni J, Ruiz N, Kim S, Silhavy TJ, Kahne D. (2005)** Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell.* 121(2):235-45.
- Wülfing C, Plückthun A. (1994)** Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 12(5):685-92.
- Yakushi T, Masuda K, Narita S, Matsuyama S, Tokuda H. (2000)** A new ABC transporter mediating the detachment of lipid-modified proteins from membranes. *Nat Cell Biol.* 2(4):212-8.
- Yura T, Tobe T, Ito K, Osawa T. (1984)** Heat shock regulatory gene (htpR) of *Escherichia coli* is required for growth at high temperature but is dispensable at low temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81(21):6803-7.
- Zahrl D, Wagner M, Bischof K, Koraimann G. (2006)** Expression and assembly of a functional type IV secretion system elicit extracytoplasmic and cytoplasmic stress responses in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 188(18):6611-21.

8. Anhang

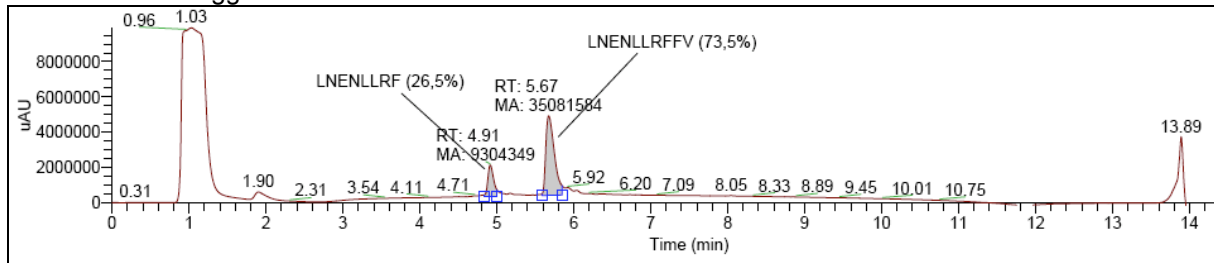
UV-Spektren der Peptidproteolysen

UV-Spektren zu Abb. 4-30: Proteolyse verschiedener Peptide durch YggG

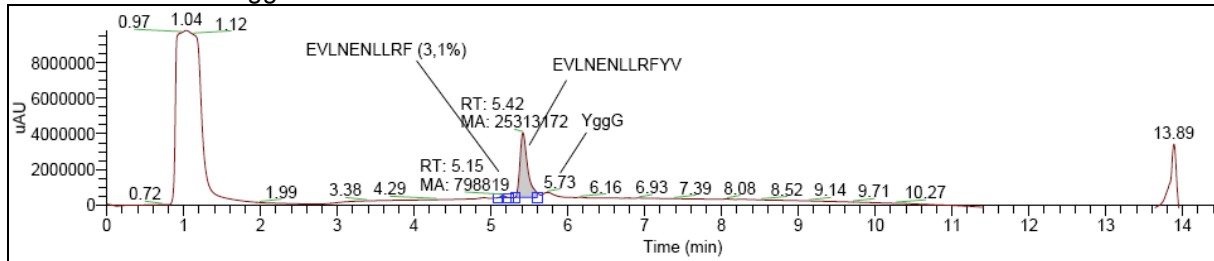
ENLLRFFV+YggG



LNENLLRFFV+YggG

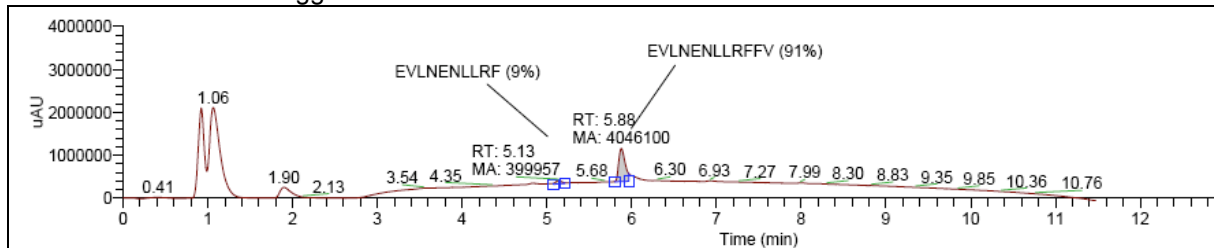


EVLNENLLRFYV+YggG

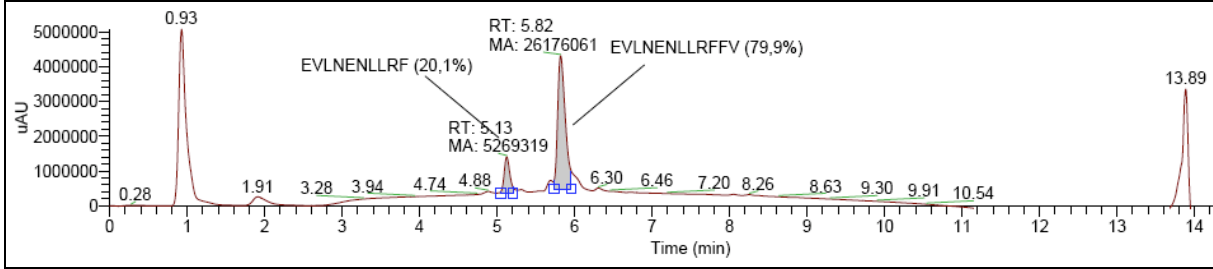


UV-Spektren zu Abb. 4-32: Zeitreihe der Proteolyse von EVLNENLLRFFV durch YggG

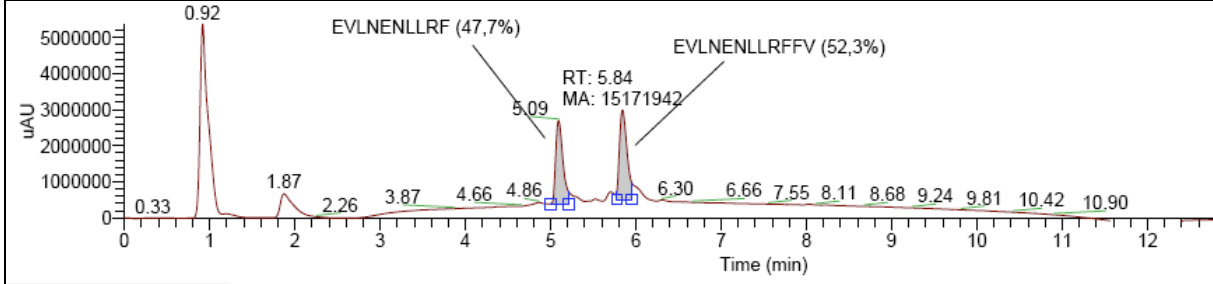
1 h EVLNENLLRFFV+YggG



4 h EVLNENLLRFFV+YggG

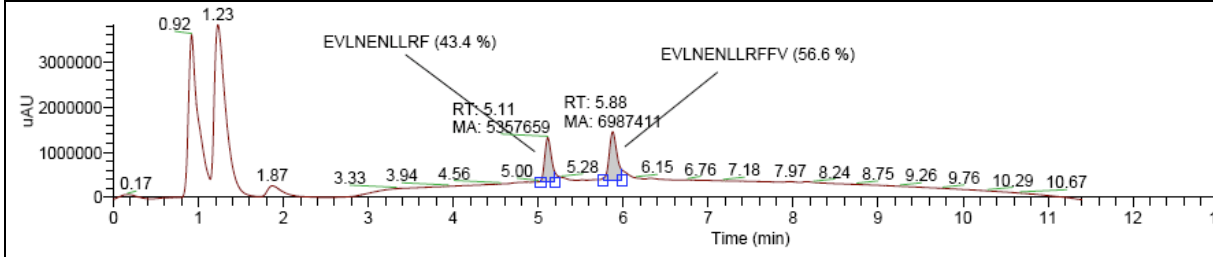


12 h EVLNENLLRFFV+YggG

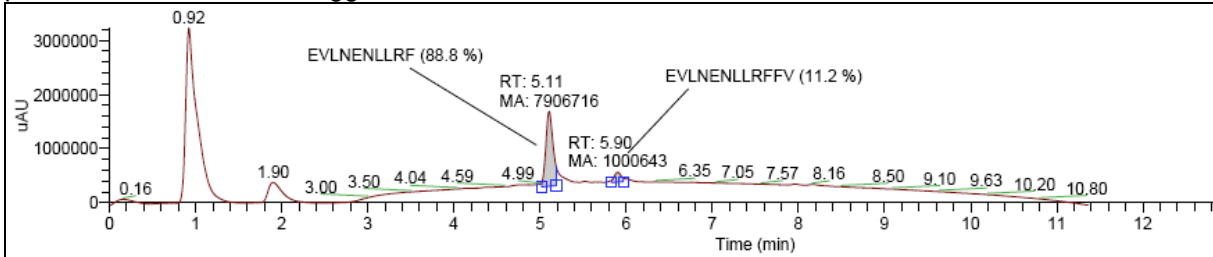


UV-Spektren zu Abb. 4-35: pH-Reihe der Proteolyse von EVLNENLLRFFV durch YggG

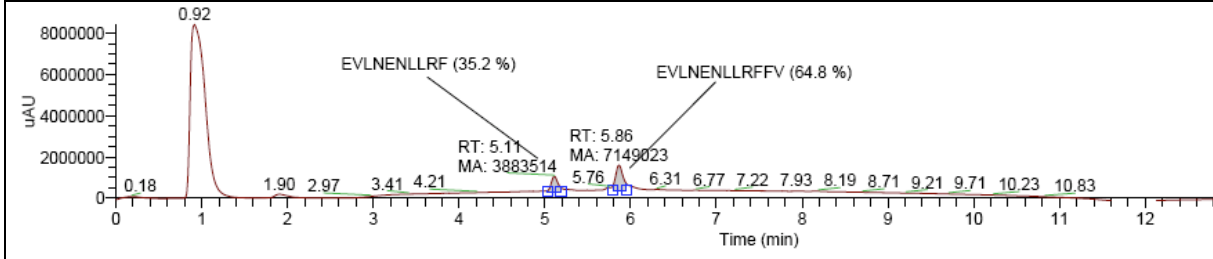
pH 5,0 EVLNENLLRFFV+YggG



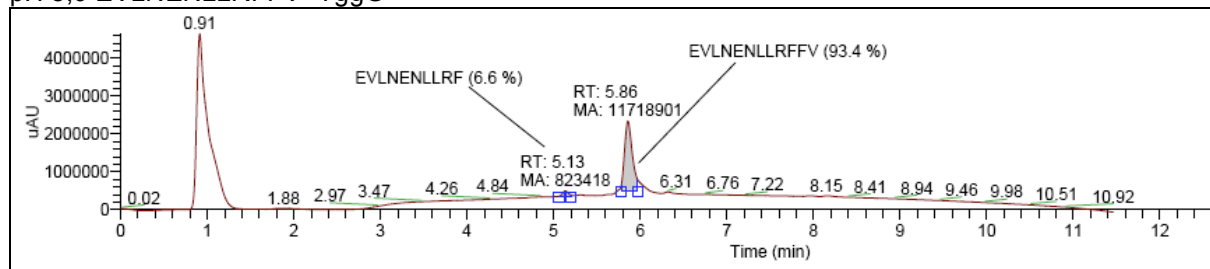
pH 6,0 EVLNENLLRFFV+YggG



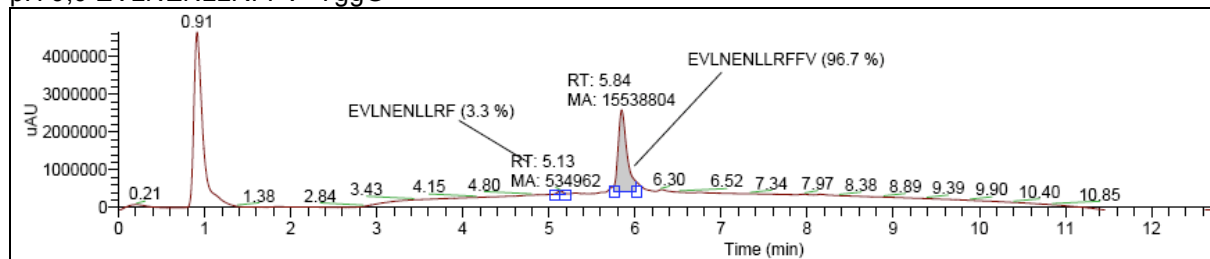
pH 7,0 EVLNENLLRFFV+YggG



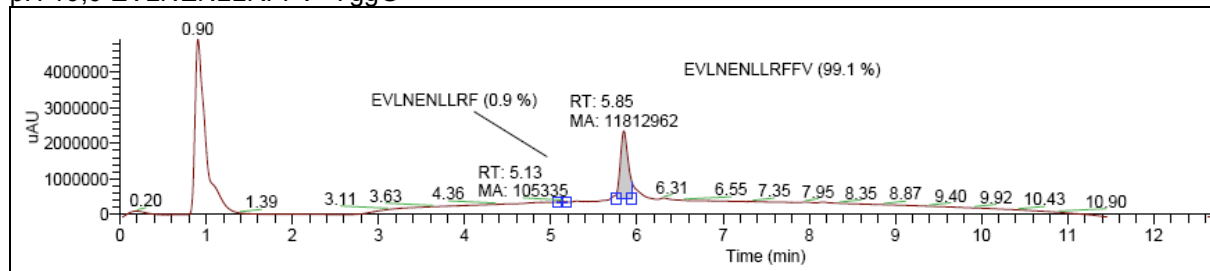
pH 8,0 EVLNENLLRFFV+YggG



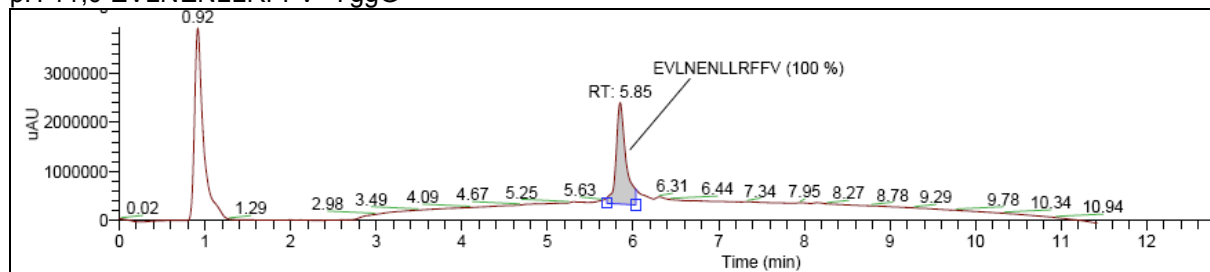
pH 9,0 EVLNENLLRFFV+YggG



pH 10,0 EVLNENLLRFFV+YggG

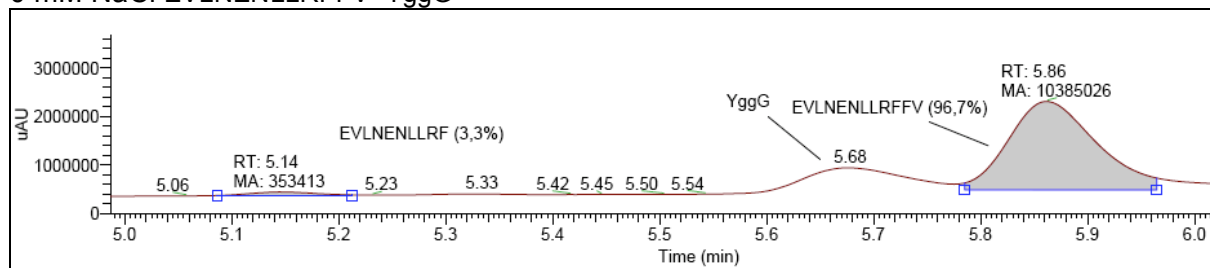


pH 11,0 EVLNENLLRFFV+YggG

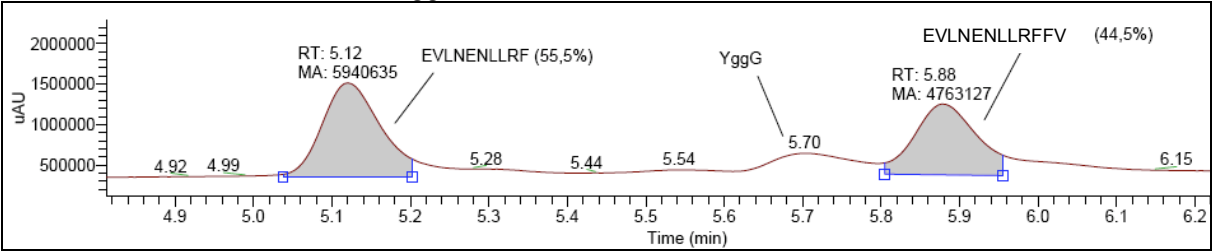


UV-Spektren zu Abb. 4-37: Salzreihe der Proteolyse von EVLNENLLRFFV durch YggG

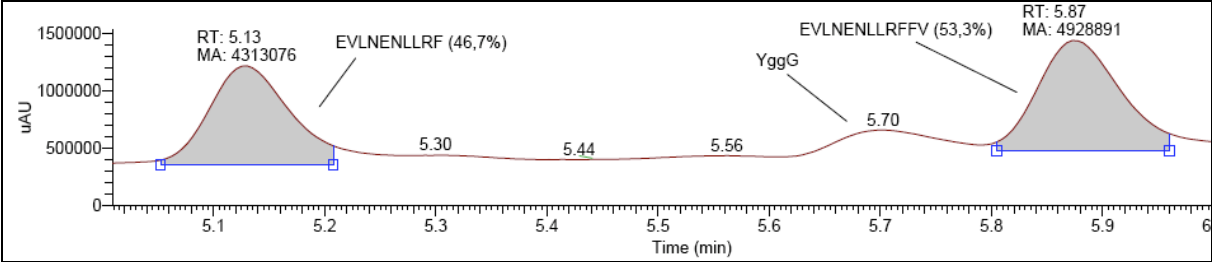
0 mM NaCl EVLNENLLRFFV+YggG



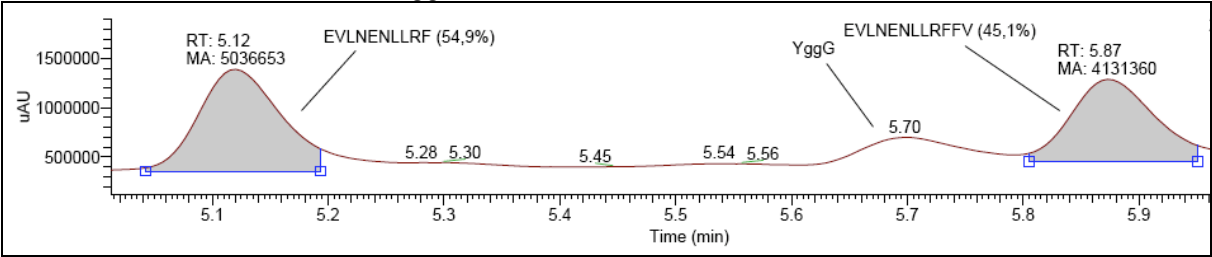
10 mM NaCl EVLNENLLRFFV+YggG



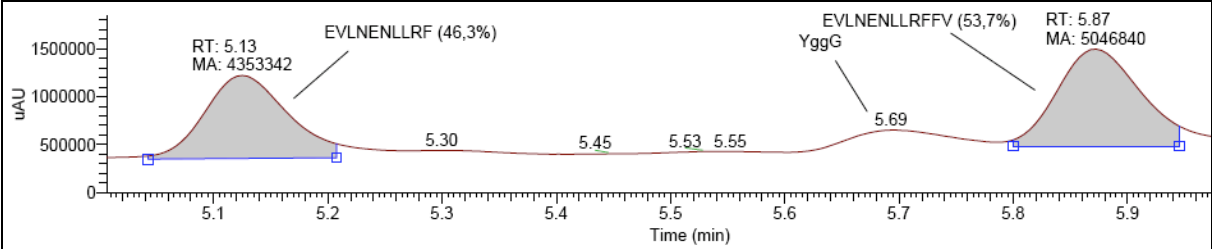
25 mM NaCl EVLNENLLRFFV+YggG



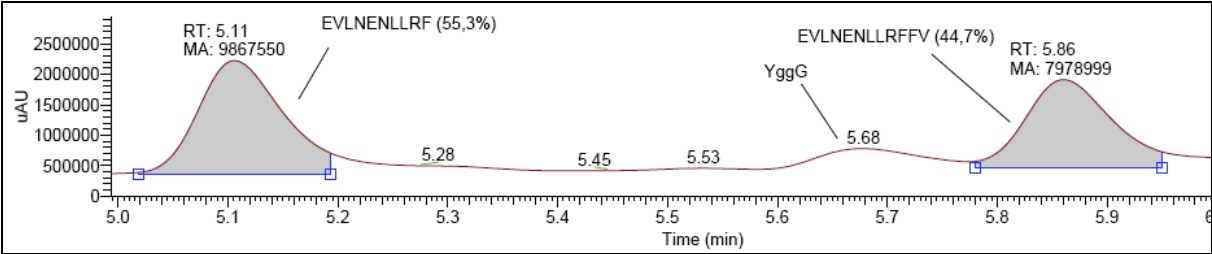
50 mM NaCl EVLNENLLRFFV+YggG



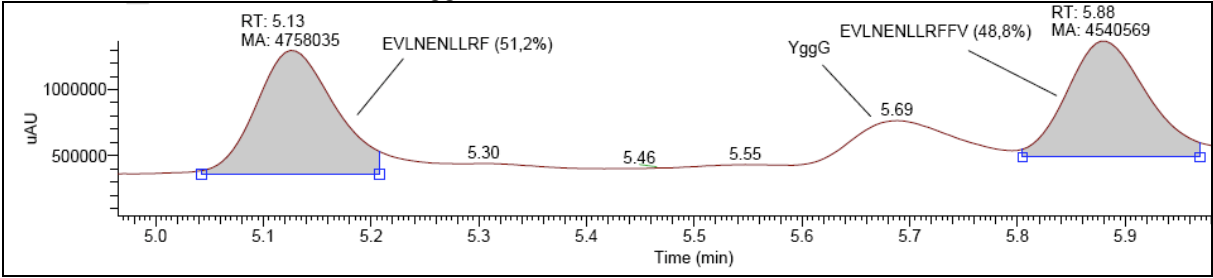
100 mM NaCl EVLNENLLRFFV+YggG



150 mM NaCl EVLNENLLRFFV+YggG

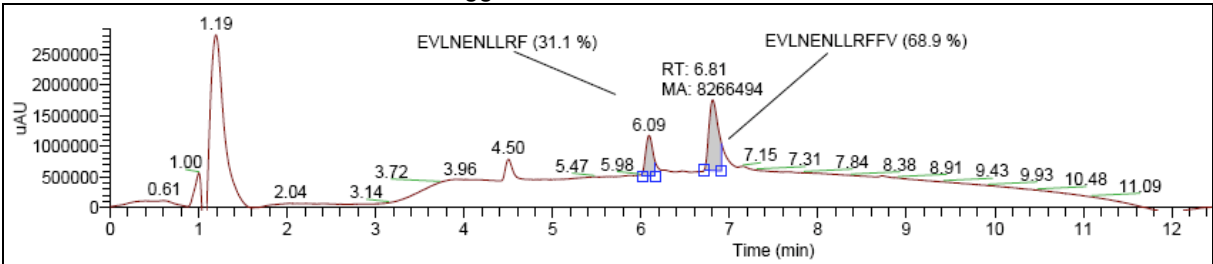


250 mM NaCl EVLNENLLRFFV+YggG

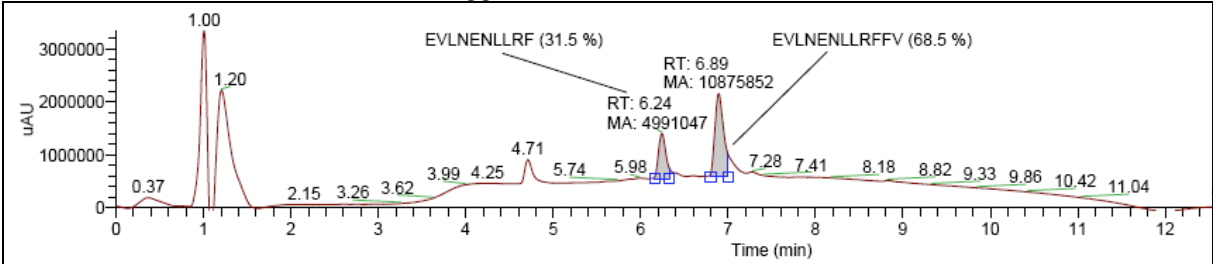


UV-Spektren zu Abb. 4-38: Phosphatreihe der Proteolyse von EVLNENLLRFFV durch YggG

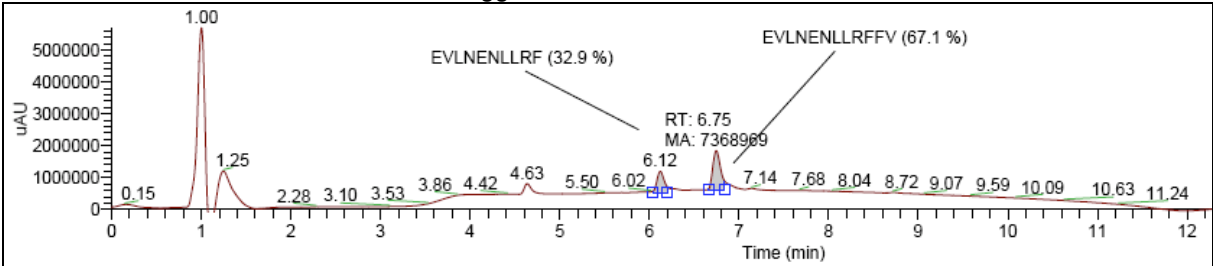
10 mM NaH₂PO₄ EVLNENLLRFFV+YggG



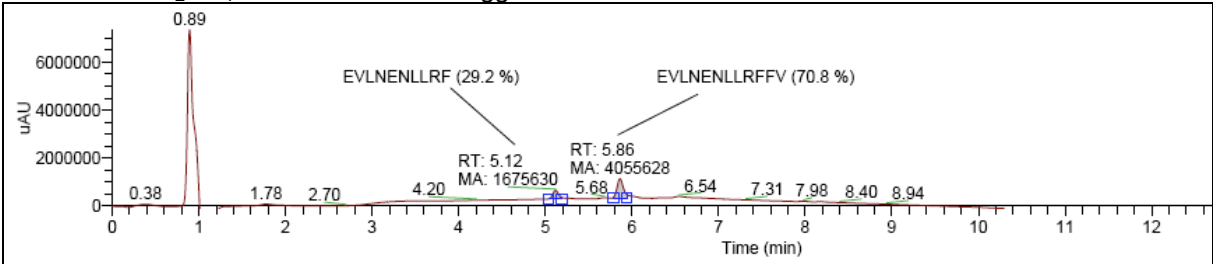
50 mM NaH₂PO₄ EVLNENLLRFFV+YggG



100 mM NaH₂PO₄ EVLNENLLRFFV+YggG

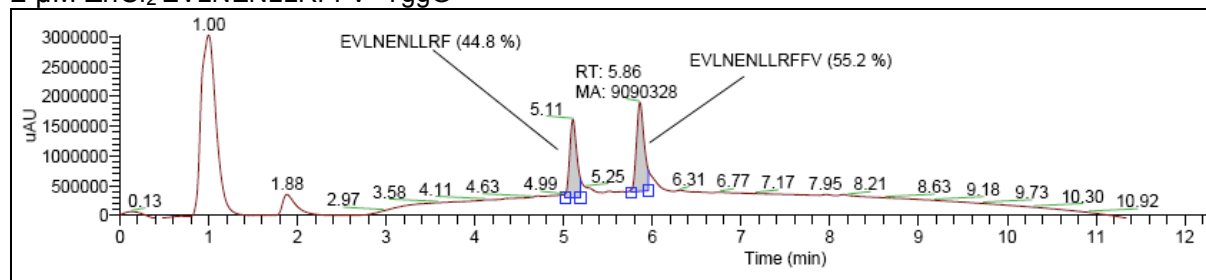


250 mM NaH₂PO₄ EVLNENLLRFFV+YggG

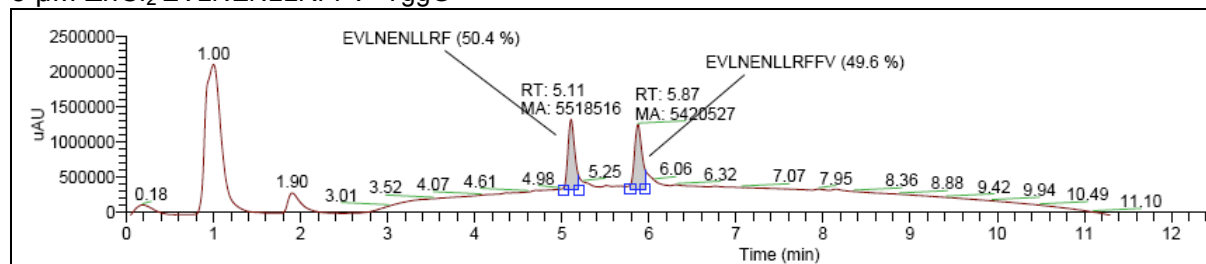


UV-Spektren zu Abb. 4-38: ZnCl_2 -Reihe der Proteolyse von EVLNENLLRFFV durch YggG

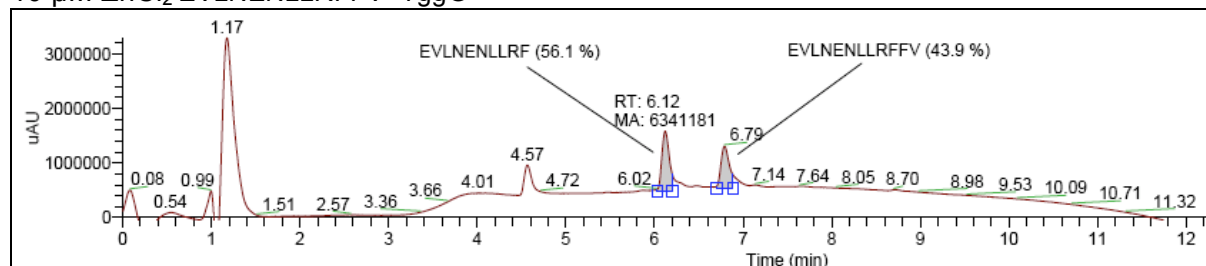
2 μM ZnCl_2 EVLNENLLRFFV+YggG



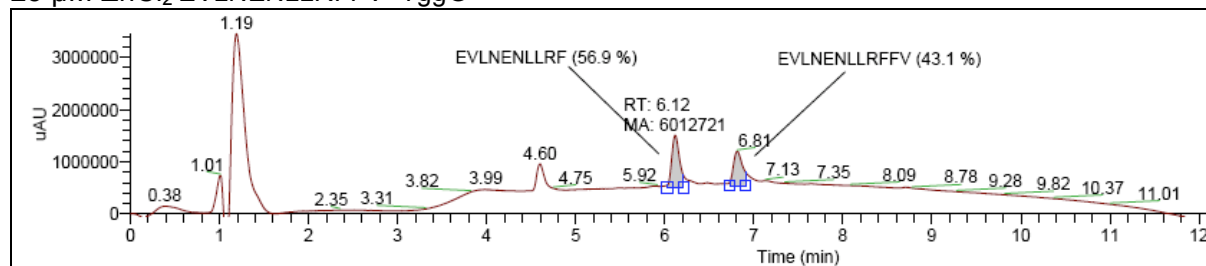
5 μM ZnCl_2 EVLNENLLRFFV+YggG



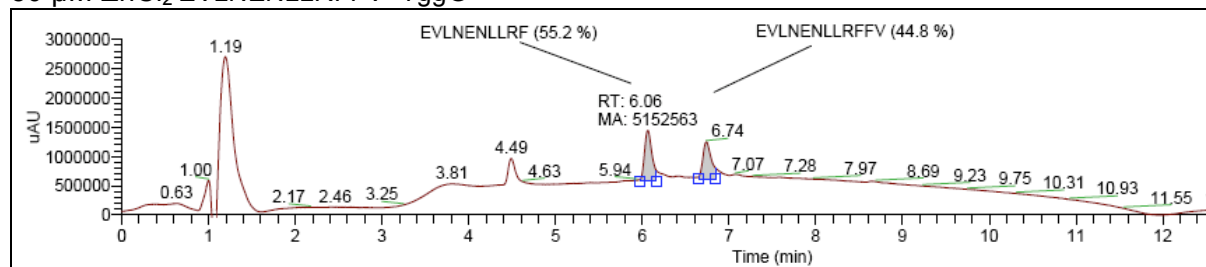
10 μM ZnCl_2 EVLNENLLRFFV+YggG

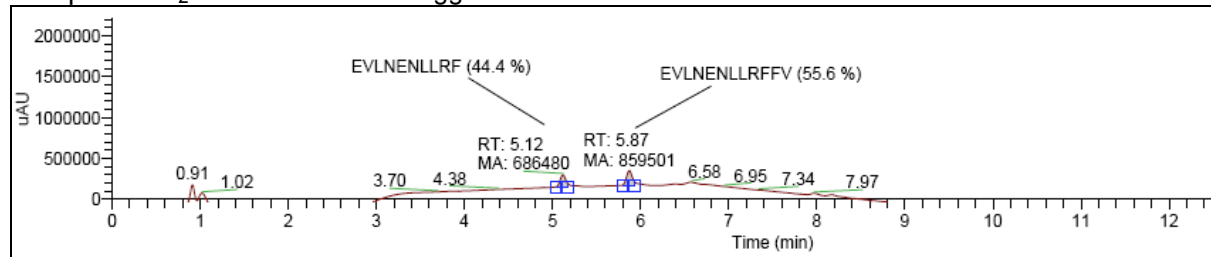
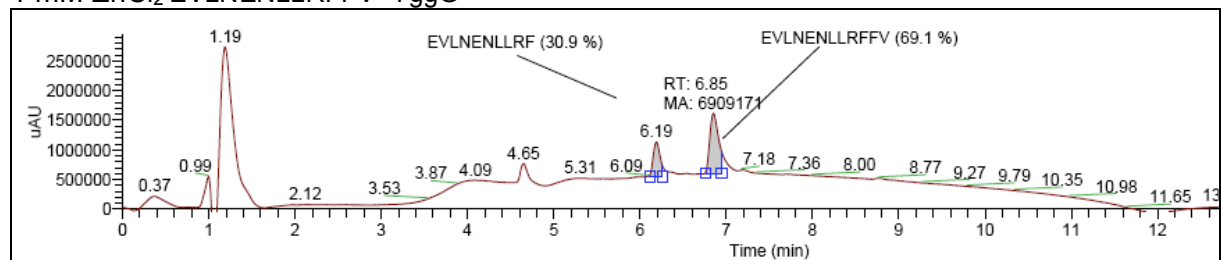


25 μM ZnCl_2 EVLNENLLRFFV+YggG



50 μM ZnCl_2 EVLNENLLRFFV+YggG



500 μ M ZnCl_2 EVLNENLLRFFV+YggG1 mM ZnCl_2 EVLNENLLRFFV+YggG

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Michael Ehrmann für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe meine Promotion durchzuführen, für die Überlassung dieses interessanten Themas zur selbständigen Bearbeitung und für seine fachliche und menschliche Unterstützung.

Des Weiteren möchte ich unseren Kooperationspartnern im Chemical-Genomic-Centre am Max-Planck-Institut in Dortmund danken. Insbesondere Patrick Hauske für die Synthese der Peptide, massenspektrometrische Analysen und interessante Diskussionen, sowie Dr. Markus Kaiser der dies ermöglicht hat.

Ebenso danke ich Dr. Urs Lewandowski für die Durchführung massenspektrometrischer Analysen.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen der AG Ehrmann für die stetige Hilfsbereitschaft, die interessanten Diskussionen und die nette, freundschaftliche Atmosphäre innerhalb und außerhalb des Laboralltags danken.

Dr. Juliane Weski, Dr. Melisa Merdanovic und Simon Pöpsel danke ich besonders für das rasche und sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Helmut Tourné und Adam Zawistowski möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft im Laboralltag danken.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie für ihre ständige Unterstützung und ihr Vertrauen in mich danken.

Mein herzlichster Dank gilt meinem Freund Lars Orzechowski für seine Geduld und Unterstützung in allen Lebenslagen.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Charakterisierung der putativen Metalloproteasen YfgC und YggG im Periplasma von *E. coli*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Christiane Lütticke befürworte.

Essen, den _____

Prof. Dr. Michael Ehrmann

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Christiane Lütticke

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Christiane Lütticke

Angaben zur Prüfung

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Mikrobiologie II der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Ehrmann

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Kaiser

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. R. Hensel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2010